



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**ESTUDO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES EM FATIAS DE  
HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDAS A GLUTAMATO  
E À PRIVAÇÃO DE GLICOSE / OXIGÊNIO**

**Karina Brongholi**

**Florianópolis, fevereiro de 2004.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**ESTUDO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES EM FATIAS DE  
HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDAS A GLUTAMATO  
E À PRIVAÇÃO DE GLICOSE / OXIGÊNIO**

**Karina Brongholi**

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Carla I. Tasca  
Departamento de Bioquímica

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção de grau de  
Mestre.**

**Florianópolis, fevereiro de 2004.**

## *Amigo*

*Amigo é quem te dá um pedacinho do chão, quando é de terra firme que você precisa, ou um pedacinho do céu, se é o sonho que te faz falta.*

*Amigo é mais que ombro amigo, é mão estendida, mente aberta, coração pulsante, costas largas. É quem tentou e fez, e não é egoísta ao compartilhar o que aprendeu. É aquele que cede e não espera retorno, porque sabe que o ato de compartilhar um instante qualquer contigo já o satisfaz. É quem já sentiu ou um dia vai sentir o mesmo que você. É a compreensão para o seu cansaço e a insatisfação para a sua reticência. É aquele que entende seu desejo de voar, de sumir devagar, a angústia pela compreensão dos acontecimentos, a sede pelo "saber".*

*Amigo é aquele que toca na sua ferida numa mesa de chopp, acompanha suas vitórias, faz piada amenizando problemas. É quem tem medo, dor, cólica, igualzinho a você. É quem sabe que viver é ter história pra contar. É quem sorri pra você sem motivo aparente, é quem sofre com seu sofrimento, é o padrinho filosófico dos seus filhos. É o achar daquilo que você nem sabia que buscava.*

*Amigo é aquele que te ouve ao telefone mesmo quando a ligação é caótica, com o mesmo prazer e atenção que teria se tivesse olhando em seus olhos. Amigo é multimídia.*

*É quem fala e ouve com o olhar. É aquele que percebe em seus olhos seus desejos, seus disfarces, alegria, medo. É quem tem uma palavra sob medida quando estes mesmos olhos estão amplificando tristeza interior.*

*Amigo é aquele que te diz "EU TE AMO" sem qualquer medo de má interpretação: amigo é quem te ama "e ponto". É verdade e razão, sonho e sentimento. Amigo é pra sempre, mesmo que o sempre não exista.*

*(autor desconhecido)*

*DEDICO ESTE TRABALHO*

*A TODOS MEUS*

*VERDADEIROS AMIGOS*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Edson e Eliana, pelo apoio e carinho durante todas as etapas deste trabalho e da minha vida.

Ao Afonso, pelo amor, companheirismo e paciência (muuuuita paciência!!!) durante esses poucos meses em que estamos juntos. “As pessoas surgem em nossas vidas por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem”. Você é muito especial para mim!!

À Juliana, minha irmã, e Leandro, pelo eterno carinho com que me recebem sempre que vou pra casa!!!

À orientadora e amiga Carla, por toda paciência, carinho e atenção dedicados a esta pesquisa e a mim durante esses dois anos (espero que aumentem bem mais!!) de convivência. Você é uma pessoa ma-ra-vi-lho-sa!!!

Agradeço ao Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré pela amizade e importante colaboração durante toda a realização deste estudo e ao Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy pelo apoio e por ter permitido o uso do espectrofotômetro. Também agradeço ao Prof. João Batista Calixto da Coordenação Especial de Farmacologia – UFSC- pelo uso do cintilador.

Aos grandes amigos Cláudia e Lúcio, por serem meu braço direito nas horas difíceis e por dividirem comigo as horas mais alegres!! Adoro vocês!!!

Especialmente aos grandes amigos, Tiago, Helena, Sheila, Carla C., Dani W., Dani P. e Rossana, pelos sorrisos e lágrimas e pelas horas de conversa e diversão que fizeram parte desta nossa convivência não só de laboratório nos últimos anos.

Aos Professores Rodrigo B. Leal e Nelson Gabilan, por todo o apoio e amizade durante o decorrer deste trabalho.

A todos os amigos que me deram a oportunidade de um convívio agradável durante o mestrado, Samira, Sandro, Camila; aos meninos do BEG: Evaldo, Carlos, Ricardo, Ezequiel e Marcos; e às meninas do laboratório do Prof. Afonso e da Profa. Risoleta: Eliana, Dani,

Taise, Juliana, Karin, Isabel, Priscilla e Ângela, por me adotarem durante as longas horas de uso do espectrofotômetro.

Ao Nivaldo, secretário da Pós Graduação em Neurociências, pela dedicação e amizade com que recebe e auxilia os alunos.

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Neurociências.

Ao Biotério Central da UFSC, pelo fornecimento de animais.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento pessoal, mesmo que tornando a situação mais difícil, pois me fizeram aprender a lutar e vencer!!!!

A Deus, por permitir que tudo isso tenha acontecido continue acontecendo...

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE ABREVIATURAS .....	iii
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
1-INTRODUÇÃO	
1.1-Transmissão Glutamatérgica .....	1
1.2- Excitotoxicidade Glutamatérgica.....	4
1.3- Espécies Reativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo .....	7
1.4- Isquemia e Reperusão .....	9
1.5- Defesas Antioxidantes.....	12
1.6- Objetivo Geral.....	16
1.7- Objetivos Específicos .....	16
2- METODOLOGIA .....	17
2.1-Materiais .....	17
2.2-Equipamentos.....	17
2.3-Animais.....	17
2.4-Preparação das fatias hipocampais.....	18
2.5-Avaliação da viabilidade celular.....	18
2.6-Avaliação da permeabilidade celular .....	19
2.7-Preparação das amostras para dosagem enzimática.....	20
2.8-Avaliação da atividade da enzima Catalase (CAT) (E.C. 1.11.1.6) .....	20
2.9-Avaliação da atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) (E.C. 1.15.1.1) ..	20
2.10-Avaliação da atividade da Glutathione Redutase (GR) (E.C. 1.6.4.2) .....	21
2.11-Avaliação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) (E.C. 1.11.1.9) .....	22

2.12-Avaliação dos níveis de Glutathione total .....	23
2.13-Quantificação de tióis proteicos (PSSG) nas fatias de hipocampo.....	24
2.14-Avaliação da captação de [ <sup>3</sup> H]L-Glutamato nas fatias de hipocampo .....	25
2.15-Dosagem de proteínas.....	25
2.16-Análise estatística.....	25
<b>3- RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
3.1- Avaliação do dano celular induzido por glutamato em fatias de hipocampo de ratos adultos .....	26
3.1.1- Determinação da viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas a glutamato em diferentes concentrações .....	26
3.1.2-Avaliação da atividade de enzimas e defesas antioxidantes em fatias de hipocampo de ratos submetidas a glutamato em situação fisiológica .....	29
3.2- Avaliação da viabilidade celular no modelo de privação de glicose/oxigênio (PGO) em fatias de hipocampo de ratos adultos .....	34
3.2.1- Avaliação da viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO na presença ou ausência de glutamato .....	34
3.2.2- Avaliação da viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	37
3.2.3- Avaliação da viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão na presença de GUO e MK-801 .....	40
3.2.4-Avaliação das defesas antioxidantes em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	43
3.3- Avaliação da captação de [ <sup>3</sup> H]Glutamato em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	51
<b>4- DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>



<b>5-CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>6-PERSPECTIVAS .....</b>	<b>63</b>
<b>7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da transmissão glutamatérgica no SNC.....	2
Figura 2. Esquema representativo dos mecanismos de degeneração celular envolvidos na isquemia .....	10
Figura 3. Representação esquemática das defesas antioxidantes no SNC .....	13
Figura 4. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato .....	27
Figura 5. Avaliação liberação de LDH em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato .....	28
Figura 6. Atividade da Catalase (CAT) em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato .....	29
Figura 7. Atividade da Superóxido dismutase (SOD) em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato .....	30
Figura 8. Atividade da Glutathione redutase (GR) em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato .....	31
Figura 9. Atividade da Glutathione peroxidase (GPx) em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato .....	32
Figura 10. Avaliação dos níveis totais de glutathione (GSH-total) em fatias de hipocampo mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato .....	33
Figura 11. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO na presença ou ausência de glutamato .....	35
Figura 12. Avaliação da liberação de LDH em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO na presença ou ausência de glutamato.....	36
Figura 13. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	38

Figura 14. Avaliação da liberação de LDH em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	39
Figura 15. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão na presença de GUO .....	41
Figura 16. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão na presença de MK-801 .....	42
Figura 17. Avaliação da atividade da CAT em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	44
Figura 18. Avaliação da atividade da SOD em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	45
Figura 19. Avaliação da atividade da GR em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	46
Figura 20. Avaliação da atividade da GPx em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	48
Figura 21. Avaliação dos níveis de glutathione total em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão.....	49
Figura 22. Avaliação do conteúdo de tióis protéicos em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	50
Figura 23. Avaliação da captação de [ <sup>3</sup> H]Glutamato em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	52
Figura 24. Esquema submetidas ao modelo de PGO e reperfusão .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: alfa-amino-3-hidróxi-metil-isoxazole

CAT: catalase

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribunocleico

DTNB: 5,5' ditiobis, ácido 2-nitrobenzóico

EAAT: transportadores de aminoácidos excitatórios

EDTA: ácido etileno dinitrilo tetra acético

EROs: espécies reativas de oxigênio

GSH: glutathiona reduzida

GSH-t: glutathiona total

GSSG: glutathiona oxidada

Glu: glutamato

GPx: glutathiona peroxidase

GR: glutathiona redutase

GUO: guanosina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

HEPES: ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico

KA: Cainato

KRB: tampão Krebs-Ringer-Bicarbonato

LDH: lactato desidrogenase

MK-801: +-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d]ciclohepteno-5,10-imina

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

$O_2^{\cdot-}$  : radical ânion superóxido

$OH^{\cdot}$  : radical hidroxila

PGO: privação de glicose/oxigênio

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: superóxido dismutase

XO: xantina oxidase

## RESUMO

O aminoácido glutamato é um importante neurotransmissor excitatório envolvido em processos fisiológicos e patológicos. A modulação de seus receptores e transportadores tem sido estudada como estratégia de neuroproteção em situações de excitotoxicidade. A isquemia, causada por uma redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo, promove uma excessiva liberação de glutamato. Nestas situações, um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou uma diminuição na capacidade antioxidante cerebral podem levar à morte celular. As enzimas antioxidantes e os batióis desempenham um papel fundamental na defesa do organismo contra os danos causados pelo estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade celular e a capacidade antioxidante de fatias de hipocampo de ratos submetidas à toxicidade glutamatérgica e à privação de glicose/oxigênio (PGO), assim como o possível papel neuroprotetor da GUO e MK-801. A captação de glutamato também foi avaliada neste modelo. Fatias de hipocampo submetidas ao glutamato, em meio fisiológico, não apresentaram alterações significativas na viabilidade celular e na atividade das enzimas catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Glutathione redutase (GR) e peroxidase (GPx) e nos níveis de glutathione (GSH-t). Fatias de hipocampo submetidas à PGO, apresentaram redução significativa na viabilidade celular e na liberação de LDH, a partir de 30 e 15 min, respectivamente. Glutamato (1mM) não potencializou o dano causado pela PGO. A reperfusão de 1 ou 2 horas não alterou a viabilidade além da observada após a PGO. A adição de GUO ou MK-801 não protegeu as fatias hipocámpais contra o dano causado pela PGO e reperfusão. As atividades das enzimas antioxidantes CAT, GR e GPx não foi alterada quando as fatias foram submetidas à PGO e reperfusão. No entanto, a atividade da SOD aumentou após 15 min de PGO seguida de reperfusão de 1 ou 2 horas. Foi observada uma redução significativa nos níveis de GSH-t após 60 min de PGO seguida por 1 e 2 horas de reperfusão, porém o conteúdo de tióis proteicos não foi alterado. As fatias apresentaram redução significativa na captação de glutamato após 60 min de PGO seguida de 2 horas de reperfusão. Sendo assim, o excesso de glutamato na fenda sináptica estaria contribuindo para a reversão dos transportadores e impedindo a captação de glutamato, o que associado à redução dos níveis de glutathione intracelular contribuem para a exacerbação dos danos causados pela privação de glicose e oxigênio.

## ABSTRACT

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter involved in physiological and pathological processes in the nervous system. Modulation of glutamate receptors or transporters is evaluated as a neuroprotective strategy in excitotoxicity. Ischemia is a transitory or permanent reduction of blood flow and promotes an excessive release of glutamate. In this situation, an increased reactive species of oxygen (ROS) generation or a decreased cerebral antioxidant ability can induce cell death. Antioxidant enzymes and biothiols play important role in the cellular defenses against oxidative stress. The purpose of this study was to evaluate cell viability and antioxidant status in rat hippocampal slices submitted to glutamate or oxygen/glucose deprivation (OGD). The putative neuroprotective action of GUO or MK-801 and glutamate uptake into slices were also evaluated. Hippocampal slices submitted to glutamate in physiological medium did not alter cell viability and the activity of the enzymes catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD), Glutathione reductase (GR) and peroxidase (GPx), and glutathione levels (GSH-t). Hippocampal slices submitted to OGD, showed significant reduction in cell viability and in LDH release, after 30 and 15 min, respectively. Glutamate (1mM) did not promote additional damage than OGD. Reperfusion of 1 or 2 hours after OGD did not potentiated cell death. GUO or MK-801 did not protect hippocampus slices against the damage caused by OGD and reperfusion. In this situation, activity of the antioxidant enzymes, CAT, GR and GPx was not altered. However, SOD activity increased after 15 min OGD followed by 1 or 2 hours of reperfusion. A significant reduction on GSH-t levels was observed after 60 min OGD and 1 or 2 hours of reperfusion, however, protein thiols content was not altered. Moreover, in slices submitted to 60 min OGD and 2 hours of reperfusion, glutamate uptake was reduced. Therefore, enhanced glutamate levels in synaptic cleft could induce transporter reversal and impair glutamate uptake, which associated to decreased glutathione levels might exacerbate the damage caused by oxygen and glucose deprivation.

## 1-INTRODUÇÃO

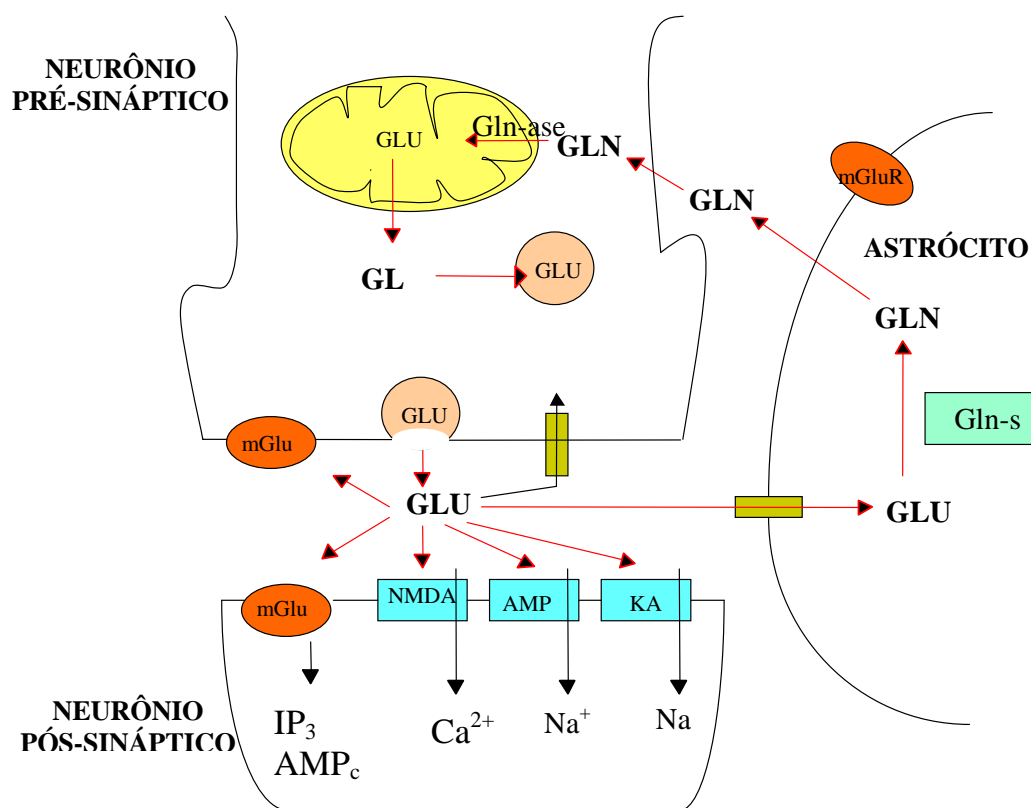
### 1.1-Transmissão Glutamatérgica

O L-glutamato é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. Desempenha um importante papel na manutenção de aspectos funcionais do cérebro, tais como fenômenos plásticos vinculados ao desenvolvimento, ao aprendizado e à memória, cognição e controle motor (COLLINGRIDGE & LESTER, 1989; MELDRUM, 2000; DANBOLT, 2001). Pode também estar envolvido na diferenciação, migração e sobrevivência celular durante o desenvolvimento (MICHAELIS, 1998).

O metabolismo celular do glutamato envolve tanto neurônios quanto astrócitos. Em neurônios, o glutamato é transportado para o interior de vesículas sinápticas por um carreador de baixa afinidade através de um mecanismo dependente de gradiente próton-eletroquímico promovido por uma ATPase (NAITO & UEDA, 1985). O glutamato é liberado para a fenda sináptica após um estímulo de despolarização promovido pela entrada de íons cálcio, denominado exocitose, podendo então interagir com seus receptores específicos localizados principalmente na membrana dos terminais pós-sinápticos e de astrócitos. O glutamato precisa ser retirado do fluido extracelular de maneira rápida e eficaz. Como parece não haver nenhuma enzima extracelular capaz de metabolizar o glutamato liberado pelos terminais pré-sinápticos, a única maneira de promover a sua retirada é através da recaptação, a qual é feita por carreadores de alta afinidade para glutamato. Estes carreadores estão localizados principalmente nas células gliais e são dependentes de íons sódio (ROBINSON & DOWD, 1997). Uma eficiente captação de glutamato, suplementada por um processo de difusão passiva para fora da fenda sináptica (ISAACSON & NICOLL, 1993), contribui para o término das ações do glutamato em seus receptores sinápticos.



Nos astrócitos, o glutamato recaptado do fluido extracelular é convertido ao aminoácido glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase e liberado por intermédio de transportadores de glutamina para o meio extracelular. A glutamina liberada pelos astrócitos é captada pelas células neuronais para formação do glutamato. O tráfego de glutamato e glutamina entre neurônios e astrócitos parece ser a maior rota de reciclagem do neurotransmissor glutamato no SNC (DANBOLT, 2001) (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema representativo da transmissão glutamatérgica no SNC. AMPc, AMP cíclico; GLU, glutamato; GLN, glutamina; Gln-s, Glutamina sintetase; Gln-ase, Glutaminase;  $\text{IP}_3$ , inositol trifosfato; mGluR, receptor metabotrópico de glutamato. Adaptado a partir de SEGOVIA *et al.* (2001).

Os carreadores glutamatérgicos dependentes de sódio e de alta afinidade, transportam glutamato de maneira dependente tanto do potencial de membrana, quanto do gradiente iônico estabelecido por ATPases, captando o glutamato do espaço extracelular e assim regulando a sua concentração. A captação de glutamato é acoplada a uma entrada de dois a três íons sódio e um próton, com a saída de um íon potássio (NELSON, 1998; GADEA & LÓPEZ-COLOMÉ, 2001). Cinco transportadores de membrana para glutamato já foram clonados e sequenciados no tecido humano (EAAT - transportadores de aminoácidos excitatórios). São eles: EAAT-1 (GLAST em ratos) localizado em astrócitos e expresso predominantemente em cerebelo; EAAT-2 (GLT-1 em ratos), também localizado em astrócitos; EAAT-3, (EAAC-1 em ratos), é o principal transportador de glutamato neuronal; EAAT-4, localizado nas células de Purkinge e no cerebelo e EAAT-5, localizado na retina (DANBOLD, 2001; ROBINSON, 2002).

A diversidade funcional do neurotransmissor glutamato é resultado da existência de uma grande variedade de receptores, os quais podem ser caracterizados em dois grupos, denominados ionotrópicos e metabotrópicos (GASIC & HOLLMAN, 1994). Os receptores ionotrópicos são uma família de canais iônicos denominados de acordo com seu agonista sintético mais seletivo: N-metil-D-aspartato (NMDA), o qual ativa canais de cálcio, alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato (AMPA) e cainato (Ka), que permeiam a entrada de sódio e potássio e são responsáveis pela rápida ativação da neurotransmissão excitatória no SNC. Os receptores metabotrópicos estão acoplados às proteínas-G e modulam a atividade de efetores intracelulares, como fosfolipases de membrana (Grupo I) e a adenilato ciclase (Grupos II e III) (DUVOISIN *et al.*, 1995).

## 1.2- Excitotoxicidade Glutamatérgica

Além de seus importantes papéis fisiológicos, quando em excesso na fenda sináptica, o glutamato pode se tornar uma potente neurotoxina. O termo excitotoxicidade foi inicialmente introduzido ao se verificar que a administração exógena de altas concentrações de glutamato (OLNEY, 1969; OLNEY & HO, 1970) ou compostos com ação agonística nos receptores para glutamato (OLNEY, 1981), eram capazes de levar à morte celular. Posteriormente, verificou-se que a aplicação de antagonistas glutamatérgicos apresentava efeitos benéficos em modelos animais envolvendo epilepsia e isquemia (MELDRUM, 1990).

Tanto em alterações neurológicas agudas (hipóxia, isquemia e epilepsia) como em alterações crônicas (doenças neurodegenerativas como demência de Alzheimer, enfermidade de Huntington, mal de Parkinson), as células neurais afetadas podem liberar grande quantidade de glutamato através de processos que envolvem a liberação vesicular e/ou a reversão dos carreadores glutamatérgicos de membrana (LIPTON & ROSENBERG, 1994; DANBOLT, 2001). O mecanismo primário da morte celular induzida por glutamato envolve o desequilíbrio iônico promovido pela entrada excessiva de cálcio, inicialmente por atuar via seus receptores ionotrópicos (KA, AMPA e NMDA) e posteriormente atuando também via seus receptores metabotrópicos (MICHAELIS, 1998).

O aumento da concentração de cálcio intracelular por períodos prolongados, ativa cascatas enzimáticas que contribuem para a morte neuronal. As lipases, tais como a fosfolipase A, quando ativadas pelo cálcio, podem promover a hidrólise de fosfolipídios, causando liberação do ácido araquidônico. O metabolismo do ácido araquidônico pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumentando a probabilidade de ocorrer a peroxidação lipídica (ADIBHATLA *et al.*, 2003). As proteases citosólicas e as nucleases também podem causar danos celulares irreversíveis atacando o citoesqueleto e

promovendo uma desorganização da cromatina e fragmentação do DNA (JIANG *et al.*, 2000; MELDRUM, 2000; FONNUM & LOCK, 2004).

Sob circunstâncias patológicas envolvendo excessiva estimulação dos receptores glutamatérgicos, a biossíntese do Óxido nítrico (NO) pode ser exacerbada, causando neurotoxicidade através da formação de espécies reativas de nitrogênio. Estes compostos podem ser extremamente danosos à célula, atuando de maneira direta sobre a peroxidação lipídica da membrana. A produção excessiva de NO no cérebro, levando à disfunção mitocondrial e depleção de energia, também é um fator que contribui para a morte neuronal observada em certas doenças neurodegenerativas (GARTHWAITE *et al.*, 1988; DAWSON & DAWSON, 1996; ALMEIDA *et al.*, 1999).

Em situações de insulto isquêmico cerebral, a redução do suprimento sanguíneo faz com que a região lesada seja privada de glicose e oxigênio, alterando o balanço iônico através da membrana. Este desbalanço causa uma liberação não controlada de glutamato, podendo levar à morte neuronal (HUNTER *et al.*, 1998; NISHIZAWA, 2001).

Quando o fluxo sanguíneo é restaurado após um episódio isquêmico (reperfusão), o oxigênio ofertado pode não ser totalmente reduzido, gerando radicais livres e assim causando peroxidação lipídica com conseqüente dano celular irreversível (SHARKEY *et al.*, 1997).

A excitotoxicidade de glutamato pode desencadear a morte necrótica ou apoptótica. Na morte celular por apoptose, não são observadas alterações na permeabilidade celular, as organelas geralmente permanecem intactas e a carga energética da célula é mantida. A apoptose usualmente requer a síntese de novas moléculas e a cromatina torna-se condensada formando grânulos nucleares e o DNA é fragmentado em frações internucleossomais. Normalmente, a apoptose envolve a ativação de caspases e proteases dependentes de cisteína (SASTRY & RAO, 2000).

Ao contrário do que é observado durante a apoptose, a morte celular necrótica envolve desbalanço na homeostasia da célula, o que leva ao inchaço de compartimentos celulares como a mitocôndria e outras organelas. Estes eventos contribuem para que haja ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular. Durante este processo, ocorre depleção da carga energética da célula (ATP) e o mesmo não é dependente da síntese de novas moléculas (SASTRY & RAO, 2000).

Efeitos neuroprotetores dos antagonistas específicos dos receptores glutamatérgicos têm sido avaliados. Entre os compostos mais freqüentemente utilizados estão os antagonistas dos receptores NMDA, como o antagonista não-competitivo (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imina (MK-801), o qual tem sido demonstrado como um agente protetor contra a morte celular induzida pela exposição a glutamato em culturas de células e em experimentos *in vivo* (SHEARDOWN *et al.*, 1990; HIMI *et al.*, 2003).

Recentes evidências têm demonstrado que os nucleotídeos da guanina (NG) além de seus importantes papéis intracelulares como moduladores da atividade das proteínas-G, fonte de energia para a síntese proteica e constituintes dos ácidos nucleicos (BOURNE *et al.*, 1990), desempenham um importante papel neuroprotetor através da modulação da transmissão glutamatérgica. Isto ocorre através da inibição da união de glutamato e análogos ionotrópicos e metabotrópicos a seus receptores de membrana e portanto, inibição das respostas celulares induzidas pela ativação de receptores do glutamato, através de uma ação extracelular (SOUZA & RAMÍREZ, 1991; PAZ *et al.*, 1994; DEV *et al.*, 1996; PAAS *et al.*, 1996; TASCA *et al.*, 1999; PORCÍUNCULA *et al.*, 2002).

A avaliação da neurotoxicidade glutamatérgica *in vivo*, demonstrou que os NG protegem contra a lesão neuronal e convulsões induzidas em ratos e camundongos pela injeção intracerebroventricular do Ácido Quinolínico, um metabólito da via de degradação do aminoácido triptofano, que age como agonista de receptores NMDA e leva à produção de

espécies reativas de oxigênio (MALCON *et al.*, 1997; SCHIMIDT *et al.*, 2000). Em estudos utilizando modelos de excitotoxicidade *in vitro*, foi observado que os NG protegem contra a toxicidade em um modelo de hipóxia (REGNER *et al.*, 1998) e previnem parcialmente a toxicidade produzida por glutamato em modelos de isquemia química (MOLZ *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Adicionalmente, foi demonstrado que os NG podem ser liberados por astrócitos (DI IORIO *et al.*, 1998) e que a concentração extracelular destes compostos eleva-se rapidamente após um período de hipóxia/hipoglicemia e permanece elevada após o insulto (CICCARELLI *et al.*, 1999). Sendo assim, tem sido demonstrado que os NG agem como compostos neuroprotetores ou neuromoduladores através da sua interação com o sistema glutamatérgico.

### **1.3- Espécies Reativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo**

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas continuamente durante o metabolismo oxidativo. As EROs incluem moléculas como o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ). Uma característica peculiar das EROs é a sua excepcional reatividade causada pela tendência de alcançar estabilidade pelo pareamento de elétrons. Dessa forma, em certas circunstâncias, os elétrons podem ser retirados de algumas moléculas biologicamente importantes, tais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (WLODEK, 2002).

Comparado a outros órgãos, o cérebro parece ser especialmente vulnerável em relação à geração e detoxificação das EROs. Nos humanos, as células neurais utilizam 20 % do oxigênio consumido pelo corpo, apesar de o cérebro compreender apenas 2 % do peso corporal (CLARKE & SOKOLOFF, 1999). Isto indica a geração de uma grande quantidade de EROs durante a fosforilação oxidativa no cérebro. Além disto, algumas regiões cerebrais

apresentam um alto conteúdo de ferro, o que auxilia na produção de EROs (GERLACH *et al.*, 1994). O SNC é altamente susceptível ao dano causado por EROs por ser rico em lipídios com ácidos graxos insaturados e por possuir de baixa a moderada atividade de enzimas antioxidantes quando comparado com o fígado ou rins (CHAN, 1996; COOPER, 1997).

O balanço entre a geração de EROs e a ativação de processos antioxidantes parece estar comprometido em várias desordens neurológicas. Já foi demonstrado que no período de reperfusão (reinício da circulação sanguínea) após um insulto isquêmico, ocorre um aumento na produção de EROs, o que leva à alteração no potencial transmembrana mitocondrial e uma rápida perda das funções mitocondriais, como a manutenção da carga energética celular (WULLNER *et al.*, 1999).

Para evitar o dano causado pelas EROs, como a quebra do DNA, peroxidação lipídica e modificação proteica, durante a evolução foram desenvolvidos mecanismos para prevenir a geração e quelar as EROs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Uma produção aumentada de EROs ou uma diminuição na capacidade antioxidante cerebral ativam certas vias que levam a necrose, apoptose e neuroinflamação com subsequente perda neuronal, podendo comprometer funções celulares vitais (DIRNAGL *et al.*, 1999).

O processo de estresse oxidativo celular ocorre quando a produção de moléculas pró-oxidantes é maior que a velocidade de seu consumo, através de diferentes mecanismos antioxidantes (SIES, 1991). Esta condição tem sido responsável por uma série de processos degenerativos, doenças e síndromes, incluindo: mutagênese, câncer, acidentes vasculares cerebrais e injúrias por isquemia e reperfusão, e enfermidades do sistema nervoso como a esclerose amiotrófica lateral, a doença de Parkinson e a demência de Alzheimer (DAVIES, 1995).

É de extremo interesse o estudo dos eventos celulares envolvidos no dano celular causado por EROs, bem como a possibilidade de modulação desses processos por compostos

neuroprotetores. Já foi demonstrado que 8-hidróxi-2-deoxiguanosina, um subproduto formado a partir do ataque de radicais hidroxil sobre a guanina constituinte do DNA, tem sido usado como um marcador de dano oxidativo do DNA (MECOCCI *et al.*, 1993).

#### **1.4- Isquemia e Reperusão**

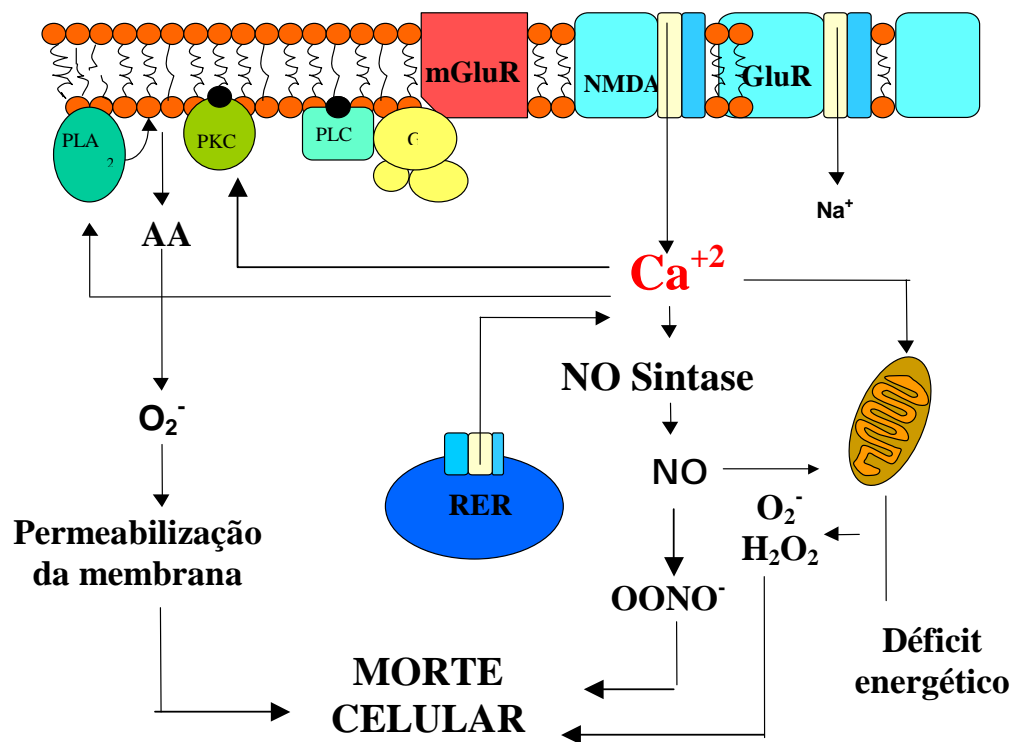
A isquemia é causada por uma redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo, e é considerada uma das principais causas de mortalidade e morbidade humanas (NISHIZAWA, 2001).

Diferentes modelos animais são utilizados para estudar a susceptibilidade de populações neurais aos insultos isquêmicos e mecanismos que envolvem a degeneração celular (CHOI *et al.*, 1987). Dentre eles podemos citar o modelo de isquemia focal, que consiste numa oclusão reversível da artéria cerebral média (ANDERSON & SIMS, 2002) e o modelo de isquemia-hipóxia perinatal, que consiste na oclusão permanente da artéria carótida com posterior manutenção dos animais recém nascidos em câmaras hipóxicas (VANUCCI *et al.*, 1999; DAFRE *et al.*, 2003).

O efeito deletério da isquemia incompleta pode ser consequência do contínuo, embora reduzido, suplemento de oxigênio e da geração de radicais livres, podendo ocasionar a liberação de aminoácidos (O'REGAN *et al.*, 1997).

Glutamato, através de seus receptores, tem demonstrado um papel importante na patogênese da isquemia. Isto pode ocorrer através do acúmulo excessivo de glutamato no espaço extracelular e subsequente ativação de receptores glutamatérgicos nas células pós sinápticas (NISHIZAWA, 2001).





**Figura 2. Esquema representativo dos mecanismos de degeneração celular envolvidos na isquemia.** AA, ácido araquidônico; G, proteína-G; mGluR, receptor glutamatérgico metabotrópico; NO, óxido nítrico; NO Sintase, sintase do óxido nítrico; PLA<sub>2</sub>, fosfolipase A<sub>2</sub>; PKC, proteína quinase C; PLC, fosfolipase C; RER, retículo endoplasmático rugoso. Adaptado a partir de DUGAN & CHOI (1999).

Durante a isquemia, ocorre um colapso do potencial de membrana, assim como um desbalanço no gradiente iônico transmembrana, podendo levar a uma reversão da captação de glutamato da fenda sináptica através dos transportadores glutamatérgicos dependentes de íons sódio (PHILLIS & O'REGAN, 2000).

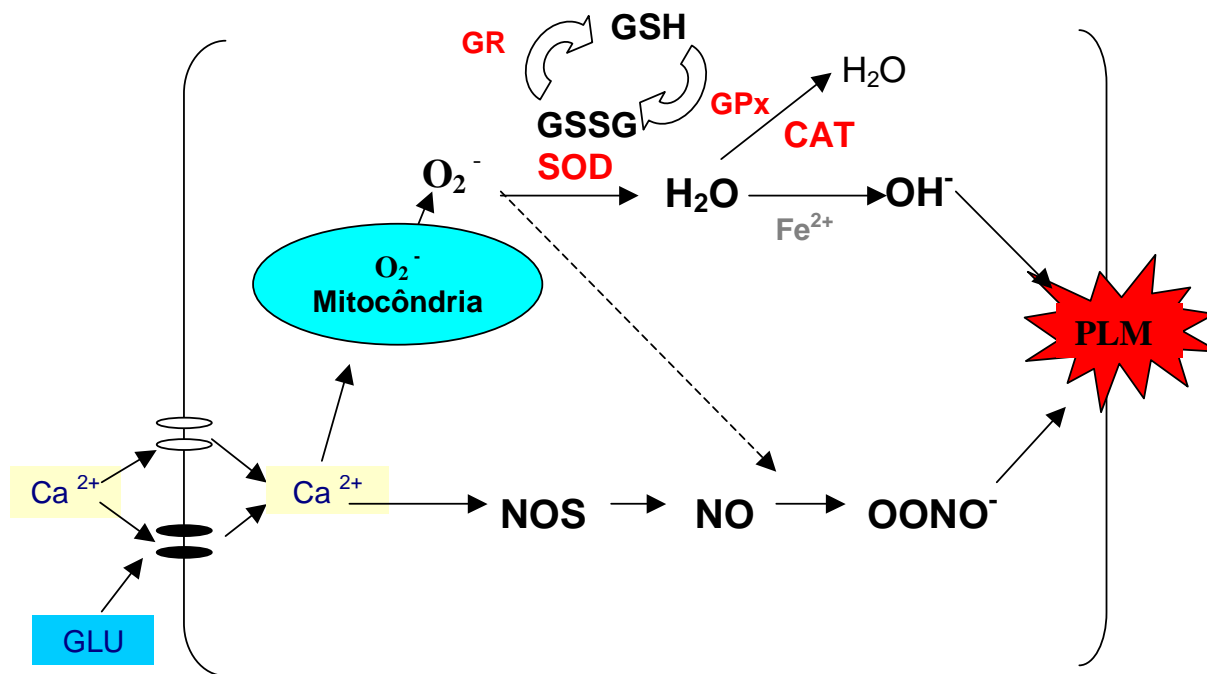
Existem diferentes mecanismos que contribuem para o efluxo de aminoácidos provocados pela isquemia no cérebro. Nos estágios iniciais do episódio isquêmico, a liberação vesicular dependente de cálcio, que é devida à entrada de cálcio extracelular através da membrana plasmática e possível liberação de cálcio do retículo endoplasmático e mitocôndria para o citosol, contribuem para o efluxo de aminoácidos. Subseqüentemente, uma reversão dos transportadores dependentes de sódio da membrana plasmática e edema induzem a liberação de glutamato dos neurônios e astrócitos, o que juntamente com a difusão de aminoácidos através da permeabilização da membrana plasmática, são os principais contribuintes para o efluxo de aminoácidos provocados pela isquemia (PHILLIS & O'REGAN, 2003).

Durante a isquemia, a deficiência de metabólitos é um dos fatores que dão início a cascata de eventos celulares que levam à morte neuronal por necrose ou apoptose (BANASIAC *et al.*, 2000). Sob condições fisiológicas, moléculas de  $\text{NAD}^+$  utilizadas nas reações da via glicolítica são geradas através do ciclo do ácido tricarboxílico. Durante condições anaeróbicas o ciclo do TCA não pode operar por falta de oxigênio. Dessa forma, uma possível fonte de  $\text{NAD}^+$  pode ser através da conversão do piruvato a lactato. Esta produção de lactato pode gerar um processo de acidose, podendo contribuir para a degeneração neuronal (SIESJO *et al.*, 1996).

### 1.5- Defesas Antioxidantes

HALLIWELL & GUTTERIDGE (1989) definem como antioxidante "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato". Antioxidantes biológicos englobam todos os compostos que, em baixas concentrações, protegem lipídios, proteínas e ácidos nucleicos do dano peroxidativo. Esta definição compreende compostos de natureza enzimática (enzimas antioxidantes) e não enzimática (biotióis).

As enzimas antioxidantes desempenham um papel fundamental na defesa do organismo contra os danos causados pelo estresse oxidativo. As principais enzimas antioxidantes são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio (MCCORD & FRIDOVICH, 1969), enquanto a CAT e a GPx têm a função de remover o  $H_2O_2$  livre no meio intracelular, prevenindo a geração do radical hidroxil (OH $\cdot$ ), o qual é altamente reativo (DRINGEN *et al.*, 2000). No cérebro, a atividade da catalase é reduzida, portanto, cabe a glutathione peroxidase regular os níveis de peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; CHAN, 1996) (Figura 3).



**Figura 3. Representação esquemática das defesas antioxidantes no SNC.** GLU, glutamato; PLM, permeabilização da membrana lipídica; NOS, óxido nítrico sintase;  $\text{OH}^\cdot$ , radical hidroxil;  $\text{OONO}^-$ , peróxido nitrito. Adaptado a partir de MATTSON (2000).

Os biotióis são antioxidantes eficazes e tem um papel biológico importante entre os compostos antioxidantes devido a sua habilidade redutiva e sua capacidade de reagir com radicais livres, protegendo a célula contra conseqüentes danos induzidos por EROs (WLODEK, 2002).

Entre os biotióis não protéicos, destaca-se o tripeptídeo glutathiona (GSH), considerado o tiol não protéico mais abundante nos mamíferos, com sua concentração no SNC variando de 1-3 mM. A glutathiona é sintetizada a partir dos aminoácidos precursores glutamato, cisteína e glicina. A enzima  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase utiliza o glutamato e a cisteína como substratos, formando o dipeptídeo  $\gamma$ -glutamylcisteína, que é então combinado com a glicina para formar a GSH em uma reação catalisada pela GSH sintetase. A GSH desempenha funções antioxidantes importantes no seqüestro de radicais livres, agindo como doadora de elétrons para redução de peróxidos orgânicos e de hidrogênio. No SNC, os astrócitos têm uma maior concentração de GSH quando comparado aos neurônios e exercem papel importante no controle da liberação de GSH para os neurônios. Entretanto, como os neurônios são incapazes de captar a GSH como um todo, a ação da enzima  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase é de extrema importância para suprir os neurônios com os aminoácidos  $\gamma$ -glutamyl e cisteinil-glicina, fundamentais para a síntese de GSH (COOPER, 1997; DRINGEN & HIRRLINGER, 2003).

A glutathiona é encontrada tanto na forma reduzida (GSH) quanto na forma oxidada (GSSG). GSH e GSSG são interconvertidas através da ação de duas enzimas: glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) (BRIGELIUS *et al.*, 1983; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; BAINS & SHAW, 1997). A função mais conhecida da glutathiona é como antioxidante, ação catalisada pela atividade da glutathiona peroxidase. A glutathiona oxidada (GSSG) formada a partir desta reação, pode ser reciclada a GSH pela ação da glutathiona redutase através de uma redução dependente de NADPH (MEISTER &

ANDERSON, 1983). GSH pode então ser liberada para o espaço extracelular (AKERBOOM & SIES, 1990) ou pode sofrer uma conjugação reversível com grupamento sulfidril de proteínas, formando tíóis protéicos (MANNERVICK & AXELSSON, 1980).

Dessa forma, uma diminuição da disponibilidade de metabólitos e oxigênio durante uma situação isquêmica pode induzir a perda da viabilidade celular causada por uma onda excitotóxica devido a um aumento na liberação de aminoácidos excitatórios. Este processo poderia comprometer as defesas antioxidantes celulares, causando o comprometimento de funções vitais desempenhadas pelo SNC.

## **1.6- Objetivo Geral**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade celular e as defesas antioxidantes celulares em fatias de hipocampo de ratos mantidas em modelo fisiológico ou submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO).

## **1.7- Objetivos Específicos**

- Avaliar o comprometimento da viabilidade celular em fatias hipocampais mantidas em modelo fisiológico ou submetidas ao modelo de PGO na ausência ou presença de glutamato;
- Avaliar os efeitos de glutamato sobre a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, e os níveis totais de glutathione em fatias hipocampais mantidas em modelo fisiológico;
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, níveis totais de glutathione e conteúdo de tióis protéicos em fatias hipocampais submetidas ao modelo de PGO e reperfusão;
- Analisar os efeitos de antagonistas dos receptores glutamatérgicos (MK-801 e guanosina), sobre a viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão;
- Avaliar os efeitos da PGO e reperfusão sobre a captação de L-[<sup>3</sup>H]Glutamato em fatias de hipocampus de ratos.

## 2-METODOLOGIA

### 2.1-Materiais

Citocromo c, 2-deoxiglicose, 5,5' ditiobis, ácido 2-nitrobenzóico (DTNB), dodecil sulfato de sódio (SDS), glutationa oxidada, glutationa redutase, glutationa reduzida, ácido morfolino propanosulfônico (MOPS), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), peróxido de ter-butila, triton X-100, xantina, xantina oxidase, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), dimetil sulfóxido (DMSO), ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA), Folin-Ciocalteu, L-glutamato e albumina bovina sérica foram obtidos da Sigma<sup>®</sup>. Cianeto de potássio, peróxido de hidrogênio e ácido perclórico foram obtidos da Merck<sup>®</sup>. Todos os demais reagentes utilizados foram de qualidade analítica.

### 2.2-Equipamentos

Espectrofotômetro Ultrospec 3000 – Pharmacia Biotech<sup>®</sup>, leitora de Elisa Microplate Reader 2001 – Whittaker Bioproducts<sup>®</sup>, Fatiador de tecidos de McIlwain – Brinkmann Laboratory Products<sup>®</sup>, Cintilador Tri-Carb 1600 TR – Packard<sup>®</sup>.

### 2.3-Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos com 60 a 90 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFSC e mantidos no biotério setorial de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica, em ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura entre 22 e 25° C e com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos adotados com os animais seguiram os códigos de ética para utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela CEUA/UFSC (nº 060/CEUA-23080.001056/2001-23).



## 2.4-Preparação das fatias hipocampais

Os animais foram mortos por decapitação e os hipocampus rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95 % O<sub>2</sub> – 5 % CO<sub>2</sub>) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos de McIlwain e pré-incubadas em tampão KRB por 30-45 min a 37° C para permitir a recuperação metabólica do tecido. No modelo fisiológico, após a pré-incubação, as fatias foram incubadas por 1 hora com glutamato (10 e 100 µM, 1 e 10 mM) e gaseificadas com carbogênio.

O modelo de privação de glicose/oxigênio (PGO), que simula uma isquemia *in vitro*, foi obtido através da utilização de um tampão composto por NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM e HEPES 770 mM. Além disso, a D-glicose foi substituída por 2-deoxi-glicose (um análogo não utilizável da glicose) e as fatias foram gaseificadas com nitrogênio, constituindo portanto, um tampão isquêmico (STRASSER, 1995; POCOCK & NICHOLS, 1998). As fatias foram incubadas no tampão isquêmico na presença de glutamato em diferentes concentrações por um período de 15 a 60 minutos. No modelo de reperfusão, o tampão isquêmico foi substituído por tampão KRB e gaseificado com carbogênio e as fatias mantidas por 1 ou 2 horas de reperfusão. A incubação foi finalizada colocando-se as fatias em banho de gelo (4° C).

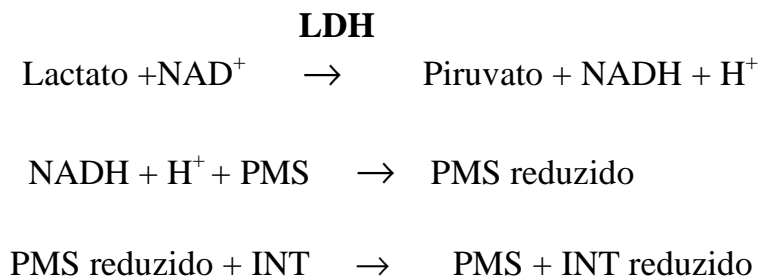
## 2.5-Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, ou Thiazolyl blue). O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido em formazan púrpura após clivagem do anel de

tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (MOSSMANN *et al.*, 1983). Após o período de pré-incubação, as fatias foram incubadas com 0,5 mg/ml de MTT por 20 min a 37° C e o formazan reduzido foi solubilizado pela adição de dimetil-sulfóxido. Foi utilizado um leitor de Elisa para a leitura da absorbância das amostras no comprimento de onda 550 nm.

## 2.6-Avaliação da permeabilidade celular

A enzima lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica e a avaliação de sua atividade no meio extracelular é um indicativo de permeabilidade da membrana plasmática. A atividade da LDH no meio extracelular foi medida através da utilização de um Kit colorimétrico (Analisa Diagnóstica®). A LDH na presença de  $\text{NAD}^+$  catalisa a oxidação do lactato, produzindo piruvato, NADH e  $\text{H}^+$ . O NADH reduz o metasulfato de fenazina (PMS), que age como um transportador de elétrons que, em uma reação acoplada, reduz estequiometricamente o cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazolio (INT) (equação 1). A absorbância do formazan de cor vermelha formado, medida em 550 nm, é diretamente proporcional à atividade da LDH. A LDH total foi determinada pela adição de 10 % de Triton X-100 e ruptura mecânica das fatias. Esta atividade foi considerada como 100% (WHITAKER, 1969).



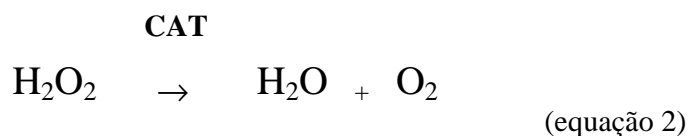
(equação 1)

## 2.7-Preparação das amostras para dosagem enzimática

Após a incubação, as fatias foram homogeneizadas em tampão de lise (Hepes 20 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 2 mM). As amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 30 min e o sobrenadante foi utilizado para dosagem enzimática e avaliação dos níveis de glutatona total. O precipitado foi utilizado para dosagem de tióis proteicos.

## 2.8-Avaliação da atividade da enzima Catalase (CAT) (E.C. 1.11.1.6)

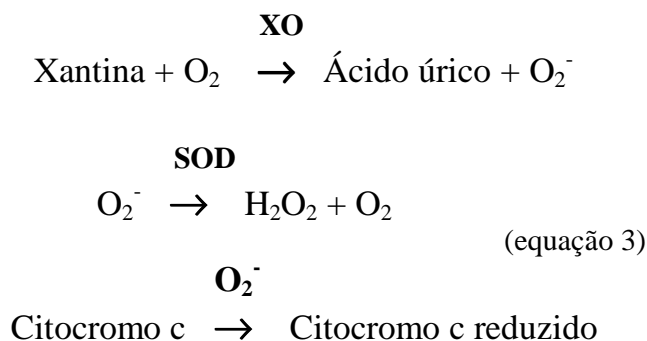
A atividade da CAT foi avaliada de acordo com AEBI (1984), que mede a decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por minuto a 30° C, lido a 240 nm (equação 2). O tampão utilizado na preparação do meio de reação foi composto por Tris 1 M, EDTA 5 mM, pH 8,0. Foram utilizados 200  $\mu\text{L}$  de amostra (fração citosólica), a qual foi adicionada a 800  $\mu\text{L}$  de meio de reação contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM. Os valores de atividade da CAT foram expressos em unidades de CAT por miligrama de proteína. Uma unidade de CAT corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ , a 30° C, em pH 8,0.



## 2.9-Avaliação da atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) (E.C. 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com MCCORD & FRIDOVICH (1969). O ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) é gerado a partir da reação catalisada pela xantina oxidase (XO), que ao promover a transformação de xantina em ácido úrico, transfere um elétron para o oxigênio ( $\text{O}_2$ ) molecular, produzindo  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Esta reação é acoplada à redução do citocromo c

pelo  $O_2^{\cdot-}$ , medindo-se o aumento de absorbância em 550 nm, a 25° C. A atividade da SOD (presente na amostra) promove uma inibição na velocidade de redução de citocromo c, uma vez que a SOD compete com o citocromo pelo  $O_2^{\cdot-}$ , dismutando-o a  $H_2O_2$  (equação 3). O meio de reação foi composto de citocromo c 10  $\mu$ M, Xantina 50  $\mu$ M, EDTA 100  $\mu$ M, cianeto de potássio 20  $\mu$ M em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 e uma solução de xantina oxidase diluída no mesmo tampão que é adicionada ao meio para que se obtenha uma variação de absorbância de 0,030 unidades de SOD por minuto, que corresponde a uma inibição na velocidade de redução de citocromo c pelo  $O_2^{\cdot-}$ , entre 20 e 40%, no meio de reação sem amostra. Os resultados foram expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade da enzima que promove 50 % de inibição na redução do citocromo c, por minuto, a 25°C, em pH 7,



## 2.10-Avaliação da atividade da Glutathiona Redutase (GR) (E.C. 1.6.4.2)

A GR é uma enzima que catalisa a redução dependente de NADPH da glutathiona oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH) (equação 4). O meio de reação utilizado para a avaliação desta enzima foi composto por tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, GSSG 1 mM e NADPH 0,225 mM. A 1 ml do meio de reação foi adicionado 20  $\mu$ l de

amostra e a atividade enzimática foi determinada pela oxidação do NADPH/min em 340 nm a 30° C (CALBERG & MANNERVIK, 1985). Os resultados foram expressos em unidades de GR por miligrama de proteína, onde uma unidade é definida como a quantidade de enzima que oxida 1 µmol de NADPH/ minuto, a 30° C, em pH 7,0.

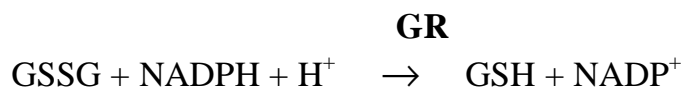
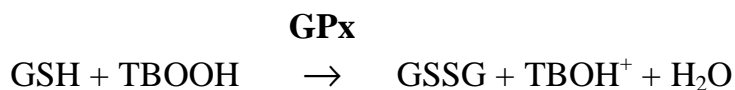
### GR



(equação 4)

## 2.11-Avaliação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) (E.C. 1.11.1.9)

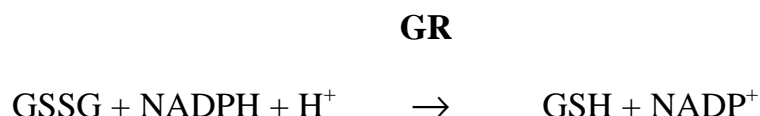
A GPx catalisa a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como co-substrato para esta reação e produzindo glutathione oxidada (GSSG). A avaliação da atividade da GPx foi baseada no método descrito por SIES *et al.* (1979), no qual baseia-se na medida do decréscimo de absorbância, promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela GR, em presença de NADPH (equação 5). A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, em presença de peróxido, catalisada pela GPx. O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, NADPH 0,2 mM, GR 0,1 U/ml e GSH reduzida 1mM. A 970 µL do meio de reação, foi adicionado 20 µl de amostra e 10 µl de peróxido de terbutila (*t*-BOOH) 0,5 mM. A absorbância relativa à oxidação do NADPH/min foi lida a 340 nm durante 2 minutos a 30° C. Os resultados foram expressos em unidades de GPx por miligrama de proteína, onde uma unidade é definida como a quantidade de enzima que oxida 1 µmol de NADPH/ minuto, a 30° C, em pH 7,0.



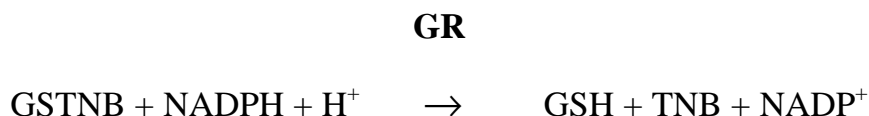
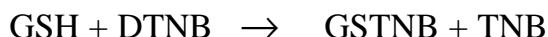
(equação 5)

## 2.12-Avaliação dos níveis de Glutathiona total

Para a determinação dos níveis de glutathiona total (glutathiona reduzida + oxidada), foi utilizado o método descrito por TIETZE (1969), modificado por AKERBOOM & SIES (1981). Este método baseia-se na reação espontânea do 5,5'-ditiobis, ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) em excesso no meio com a GSH, formando o ânion cromóforo ácido tionitrobenzóico (TNB) e o conjugado do tiol (GSH) com outro TNB (GSTNB). GSTNB é clivado enzimaticamente pela GR, utilizando NADPH como cofator. Desta reação resulta o tiol (GSH) e outro ânion cromóforo TNB. Portanto, para cada molécula de GSH, duas de TNB são formadas. Quando GSSG está presente, primeiramente acontece a reação:



Para então iniciar as reações:



Imediatamente após o período de incubação, as fatias foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,5 M, centrifugadas por 2 minutos a 15.000g e neutralizadas com KOH 2M, contendo tampão MOPS 0,3 M. O neutralizado foi novamente centrifugado a 15.000 g e o sobrenadante foi adicionado ao meio de reação contendo os seguintes reagentes: tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,0, DTNB 0,1 mM, NADPH 0,2 mM em 0,5 % de  $\text{KHCO}_3$  e GR 0,1 U/ml. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de glutatona/ miligrama de proteína. Uma curva padrão de GSSG serviu para comparação com a leitura de equivalentes de GSH-total das amostras, a qual foi realizada a 25° C por 3 min, a 412 nm. A inibição da GR é um fator crítico do método. Para corrigir esta inibição, uma quantidade conhecida de GSSG (0,5  $\mu\text{M}$  em 50  $\mu\text{l}$  de tampão) foi adicionada à amostra, servindo como um controle interno (DAFRÉ, 1996).

### **2.13-Quantificação de tióis proteicos (PSSG) nas fatias de hipocampo**

O método utilizado para avaliação da formação de tióis protéicos foi descrito por ROSSI *et al.* (1995) e baseia-se no fato das proteínas desnaturadas exporem grupos -SHs, anteriormente inacessíveis, e estes são capazes de liberar a GSH ligada a proteínas por pontes dissulfetos (PSSG). As fatias foram homogeneizadas em PCA 0,5 M e centrifugadas a 15.000 g por 2 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 1 ml de TCA 1,5% - EDTA 0,5 mM e centrifugado novamente a 15.000g por 2 minutos. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes. Após as três lavagens, o precipitado foi ressuspensão em 1 ml de tampão TRIS/HCl 0,5M, pH 8,0 / SDS 0,1% e incubado com 20 $\mu\text{l}$  de DTNB 4,2 mM (1,67 mg/ml em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0) por 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 15.000 g por 2 minutos e o sobrenadante lido a 412 nm.

## 2.14-Avaliação da captação de [ $^3\text{H}$ ]L-Glutamato nas fatias de hipocampo

A captação de glutamato foi realizada conforme previamente descrito (FRIZZO *et al.*, 2002). Após serem submetidas aos diferentes tratamentos, as fatias foram pré-incubadas por 15 minutos a 35° C, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS =  $\text{CaCl}_2$  1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,65 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,27 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,1 mM, D-glicose 2 mM e Hepes 5 mM). A captação iniciou-se com a adição de 100  $\mu\text{M}$  de L-[ $^3\text{H}$ ]Glutamato (0,33  $\mu\text{Ci/ml}$ ), permanecendo por 7 minutos. A incubação foi terminada com a retirada do meio de captação e as fatias foram lavadas duas vezes com 1 ml de HBSS gelado. 300  $\mu\text{l}$  de uma solução de NaOH 0,1 N/ SDS 0,01 % foram adicionados para solubilização das fatias. Após completa solubilização, os lisados foram utilizados para determinação do conteúdo intracelular de L-[ $^3\text{H}$ ]Glutamato através de um contador para cintilação líquida. A captação de glutamato independente de íons sódio, foi realizada através da substituição do HBSS por HBSS-colina (onde o NaCl e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  do HBSS foram substituídos Cloreto de colina, 137 mM) e estes valores foram subtraídos dos valores de captação total, para se obter a captação específica. Os resultados foram expressos em nmol de L-[ $^3\text{H}$ ]Glutamato por miligrama de proteína.

## 2.15-Dosagem de proteínas

O conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método de LOWRY *et al.* (1951). Albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

## 2.16-Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, quando necessário. Os resultados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ .



### **3-RESULTADOS**

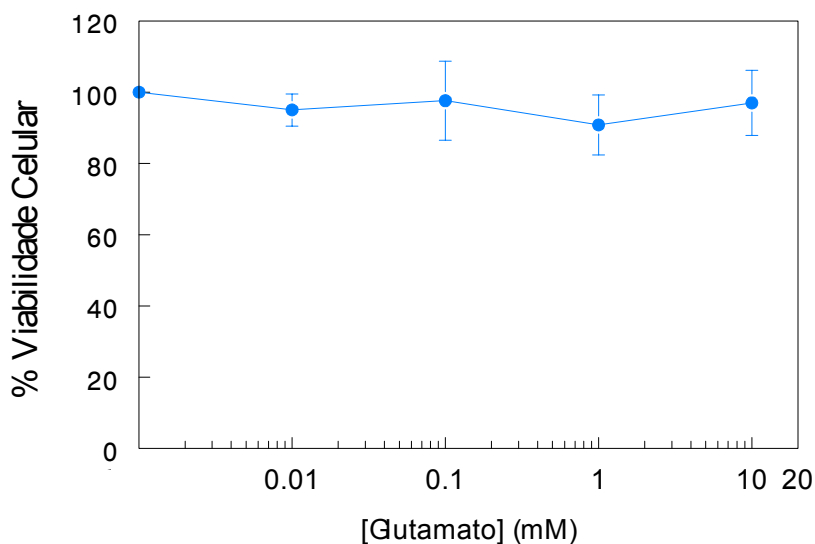
#### **3.1- Avaliação do dano celular induzido por glutamato em fatias de hipocampo de ratos adultos**

##### **3.1.1- Determinação da viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas a glutamato em diferentes concentrações**

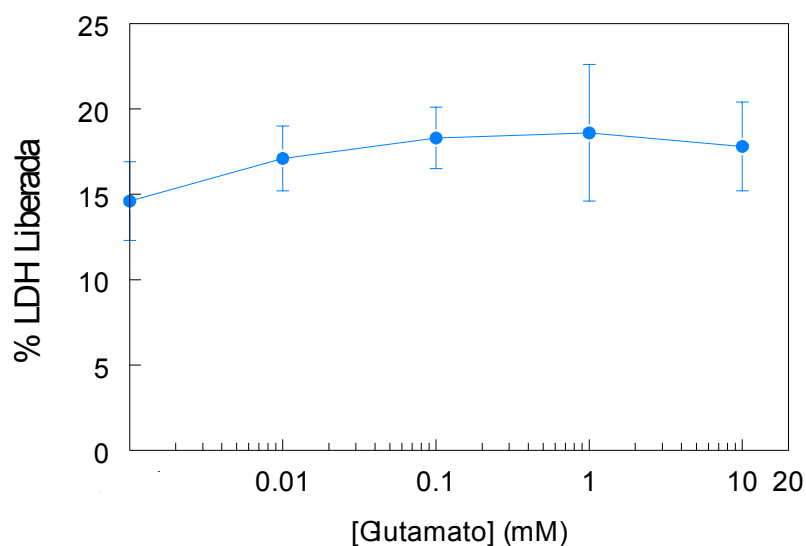
O objetivo inicial deste estudo foi avaliar possíveis alterações na viabilidade celular e na atividade das enzimas antioxidantes em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas e submetidas ao insulto com glutamato. Neste modelo, as fatias foram incubadas por um período de 60 min na presença de glutamato em concentrações crescentes (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM e 10 mM) no tampão Krebs-Ringer bicarbonato, que mimetiza o meio fisiológico extracelular.

Para avaliar a viabilidade celular foram utilizados os métodos do MTT, que evidencia o comprometimento da atividade redutora celular, e da avaliação da liberação da LDH, que indica alteração na permeabilidade da membrana celular. As fatias de hipocampo incubadas com concentrações crescentes de glutamato em situação fisiológica, não apresentaram redução na viabilidade celular (Figura 4).

A Figura 5 mostra o perfil de liberação de LDH nas fatias de hipocampo expostas a concentrações crescentes de glutamato. Nenhuma diferença significativa foi observada na porcentagem de LDH liberada para o meio extracelular entre as fatias de hipocampo controle e as incubadas com glutamato.



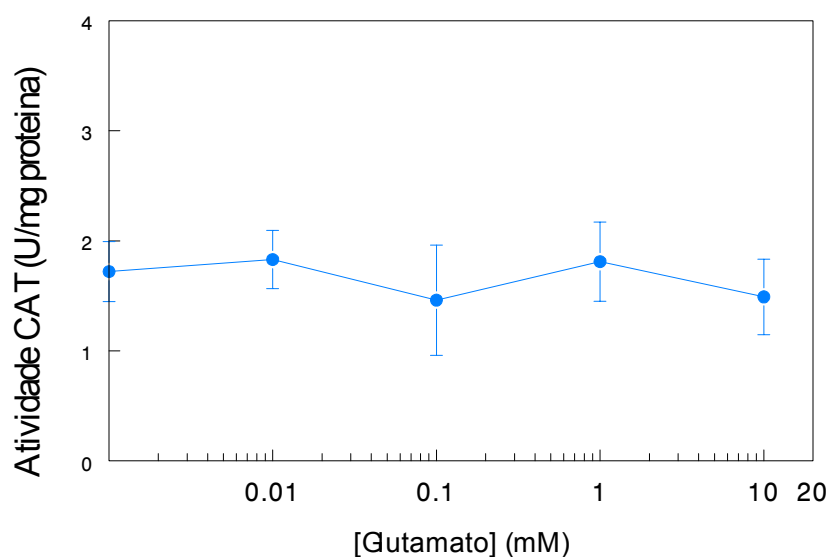
**Figura 4. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato.** Fatias de hipocampo foram incubadas por 60 min na presença de 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM ou 10 mM de glutamato. A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco experimentos realizados em triplicatas.



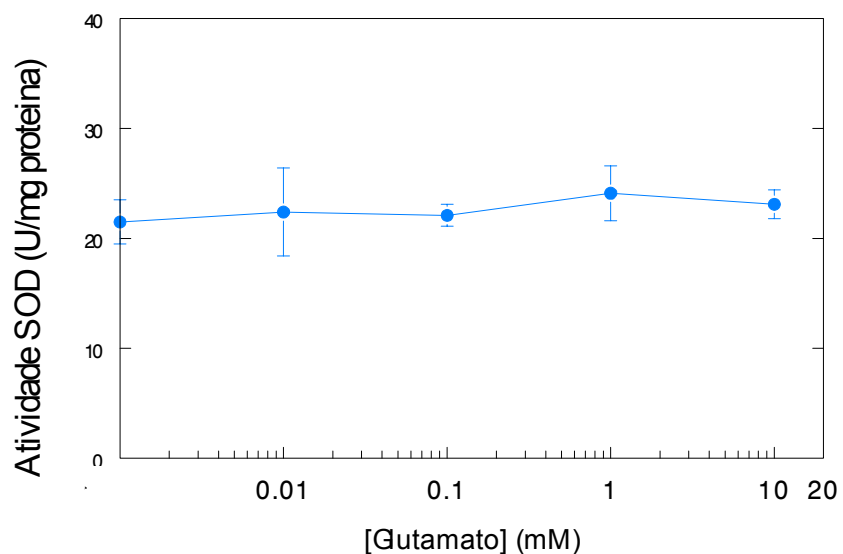
**Figura 5. Avaliação liberação de LDH em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato.** Fatias de hipocampo foram incubadas por 1 hora na presença de 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM ou 10 mM de glutamato. A atividade extracelular da LDH foi dosada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco experimentos realizados em triplicatas.

### 3.1.2-Avaliação da atividade de enzimas e defesas antioxidantes em fatias de hipocampo de ratos submetidas a glutamato em situação fisiológica.

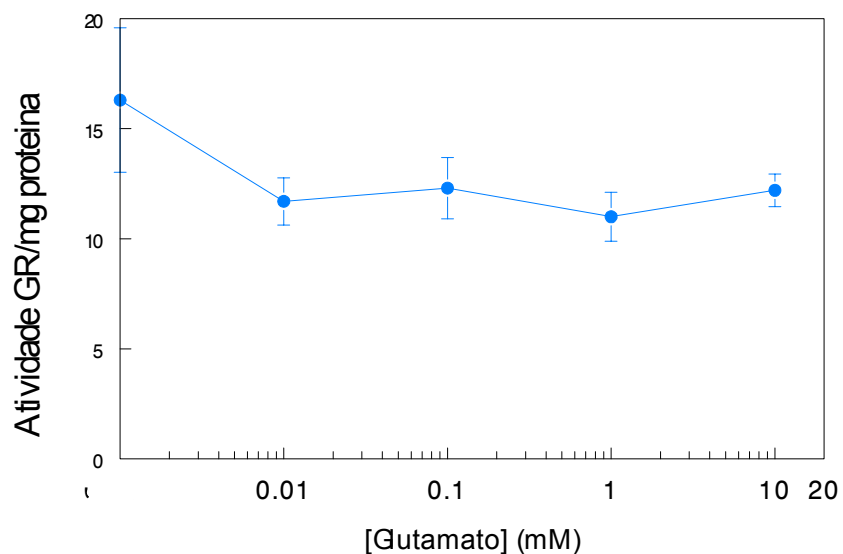
A atividade das enzimas antioxidantes CAT (Figura 6), SOD (Figura 7), GR (Figura 8), GPx (Figura 9) e os níveis de glutathiona (Figura 10) foram quantificados nas fatias de hipocampo mantidas em condições fisiológicas e na presença de glutamato (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM e 10 mM). Nenhuma alteração na atividade destas enzimas foi observada nas fatias incubadas com glutamato, em relação ao grupo controle.



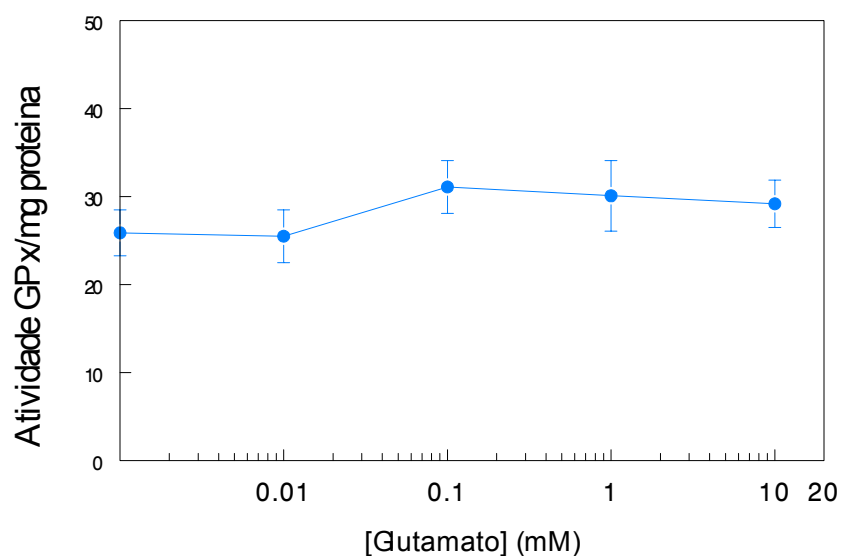
**Figura 6. Atividade da Catalase (CAT) em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato.** Fatias de hipocampo foram incubadas por 60 min na presença de 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM ou 10 mM de glutamato. A atividade da CAT foi dosada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de quatro experimentos realizados em triplicatas.



**Figura 7. Atividade da Superóxido dismutase (SOD) em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato.** Fatias de hipocampo foram incubadas por 60 min na presença de 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM ou 10 mM de glutamato. A atividade da SOD foi dosada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de quatro experimentos realizados em triplicatas.

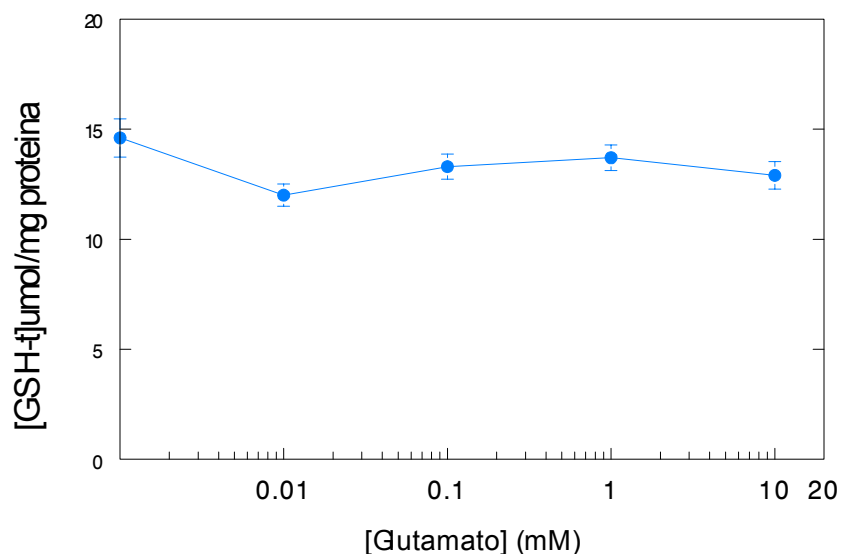


**Figura 8. Atividade da Glutathione redutase (GR) em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato.** Fatias de hipocampo foram incubadas por 60 min na presença de 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM ou 10 mM de glutamato. A atividade da GR foi dosada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos realizados em triplicatas.



**Figura 9. Atividade da Glutathione peroxidase (GPx) em fatias de hipocampo de ratos mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato.** Fatias de hipocampo foram incubadas por 60 min na presença de 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM ou 10 mM de glutamato. A atividade da GPx foi dosada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos realizados em triplicatas.

Os níveis de GSH total (glutathiona reduzida + oxidada) nas fatias de hipocampo incubadas com glutamato (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM e 10 mM) não apresentaram alterações significativas quando comparadas àquelas mantidas em condições fisiológicas (Figura 10).



**Figura 10. Avaliação dos níveis totais de glutathiona (GSH-total) em fatias de hipocampo mantidas em condições fisiológicas na presença de concentrações crescentes de glutamato.** Fatias de hipocampo foram incubadas por 60 min na presença de 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM 10 mM de glutamato. A avaliação dos níveis totais de GSH foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos realizados em triplicatas.

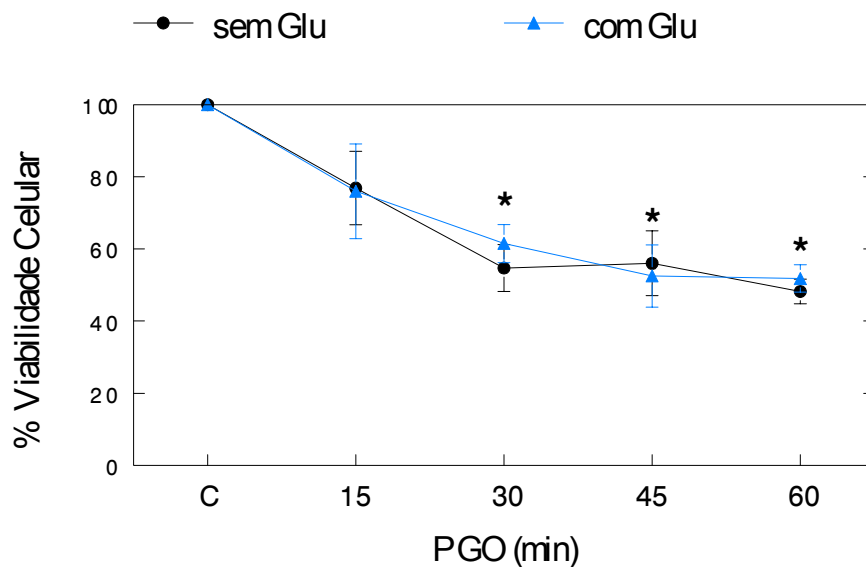


Estes experimentos demonstraram que glutamato, mesmo em altas concentrações (10 mM), não altera a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR) nem os níveis totais de glutathione e não diminuiu a viabilidade celular (pelas metodologias utilizadas) em fatias de hipocampo de ratos mantidas em situação fisiológica.

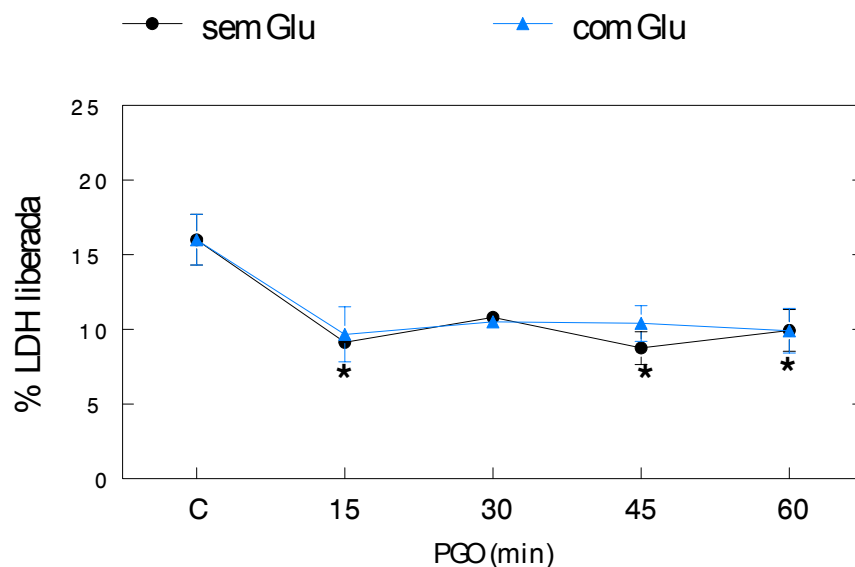
### **3.2-Avaliação da viabilidade celular no modelo de privação de glicose/oxigênio (PGO) em fatias de hipocampo de ratos adultos**

#### **3.2.1- Avaliação da viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO na presença ou ausência de glutamato**

A avaliação da viabilidade celular foi realizada em fatias de hipocampo submetidas à PGO por 15, 30, 45 e 60 min na presença ou ausência de glutamato. Foi observada uma redução na viabilidade celular (Figura 11) e na liberação de LDH (Figura 12) nas fatias mantidas sob privação de glicose/glicogênio a partir de 30 min e 15 min, respectivamente. A adição de glutamato (1mM) às fatias submetidas à PGO, que é um modelo de isquemia *in vitro*, não alterou estes dois parâmetros.



**Figura 11. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO na presença ou ausência de glutamato.** Fatias foram incubadas por 15, 30, 45 ou 60 min no modelo de PGO com ou sem glutamato (1mM). No grupo controle (C) as fatias foram incubadas com KRB por 1 hora. A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de quatro experimentos realizados em triplicata. \*médias significativamente diferentes do controle,  $p < 0,05$  (ANOVA seguida do teste de Tukey).



**Figura 12. Avaliação da liberação de LDH em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO na presença ou ausência de glutamato.** Fatias foram incubadas por 15, 30, 45 ou 60 min no modelo de PGO com ou sem glutamato (1mM). No grupo controle (C) as fatias foram incubadas com KRB por 1 hora. A avaliação da liberação de LDH foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos realizados em triplicata. \* médias significativamente diferentes do controle,  $p < 0,05$  (ANOVA seguida do teste de Tukey).

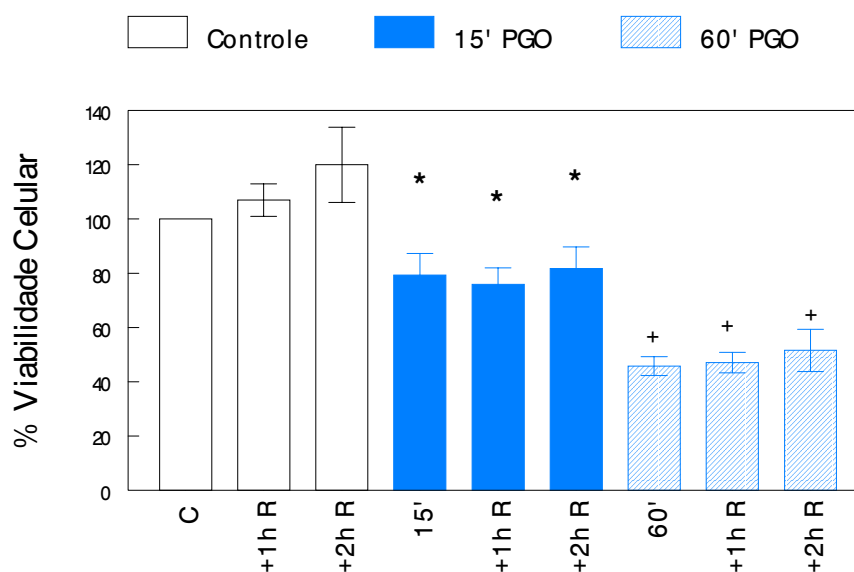
Os resultados obtidos nestes experimentos foram utilizados para definir os períodos de privação de glicose/oxigênio de 15 e 60 min como aqueles que seriam utilizados nos experimentos de reperfusão (re-oxigenação e retorno do fornecimento de glicose às células). Após 15 min de privação de glicose e oxigênio, as células começaram a apresentar alterações na sua viabilidade e após 60 min foi observada uma alteração mais significativa na viabilidade celular.

### **3.2.2- Avaliação da viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão**

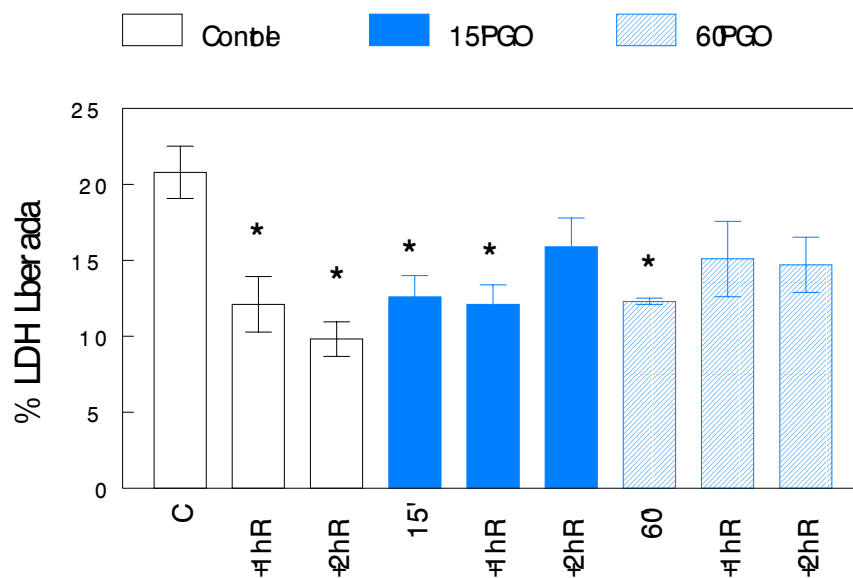
Após a exposição ao modelo de PGO, as fatias foram incubadas com tampão fisiológico (KRB) e gaseificadas com carbogênio por um período de reperfusão de 1 ou 2 horas, quando foi analisada a viabilidade celular (Figura 13) e a liberação de LDH (Figura 14).

As fatias submetidas ao modelo de PGO por 15 ou 60 min apresentaram uma diminuição na viabilidade celular (Figura 11). Após os períodos de reperfusão, foi observada uma estabilização na viabilidade celular, isto é, não foi evidenciado dano adicional às fatias hipocampais, além do observado durante o período de PGO (Figura 13).

Foi observada uma pequena, porém significativa, redução na atividade da LDH quando as fatias mantidas na situação controle (C) foram submetidas à reperfusão (+1h R e +2h R). Além disto fatias submetidas à PGO por 60 min, e à PGO por 15 min seguida de reperfusão de 1 hora, também apresentaram redução na porcentagem de LDH liberada (Figura 14).



**Figura 13. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), por 15 min (15'), ou 60 min (60') no modelo de PGO seguido de 1 hora (+ 1h R) ou 2 horas (+ 2h R) de reperfusão. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de quatro experimentos realizados em triplicata. \* indica médias significativamente diferentes do controle e do grupo 60 min; + indica médias diferentes do controle e do grupo 15 min,  $p < 0,05$  (ANOVA seguida do teste de Tukey).



**Figura 14. Avaliação da liberação de LDH em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), por 15 min (15'), ou 60 min (60') no modelo de PGO seguido de 1 hora (+ 1h R) ou 2 horas (+ 2h R) de reperfusão. A liberação de LDH foi avaliada conforme descrito na Metodologia. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de quatro experimentos realizados em triplicata. \*indica médias significativamente diferentes do controle,  $p < 0,05$  (ANOVA seguida do teste de Tukey).

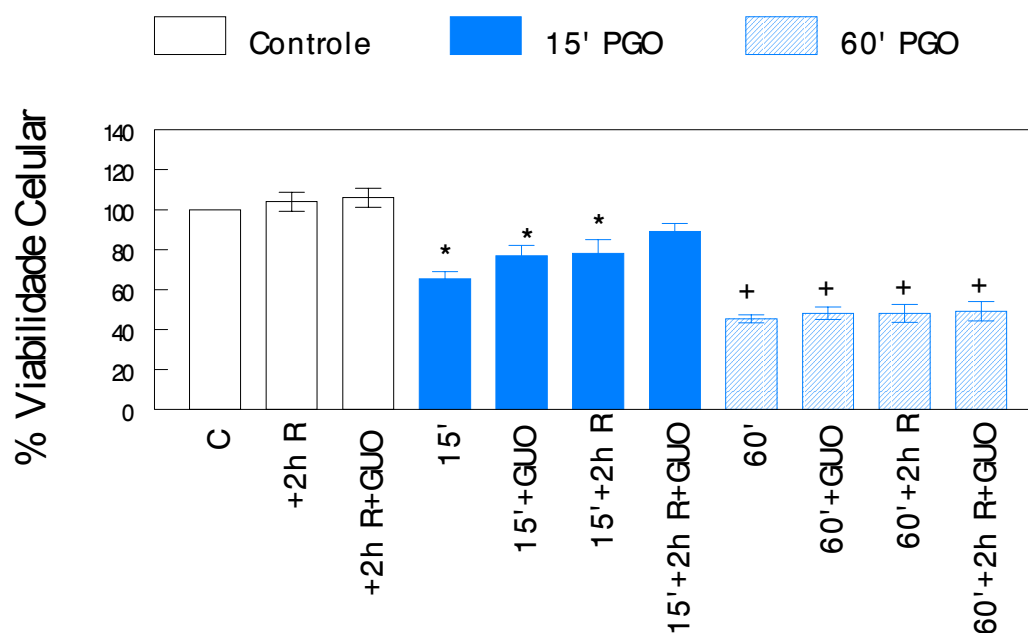
### **3.2.3- Avaliação da viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperusão na presença de GUO e MK-801**

A neuroproteção pela guanosina (GUO), já foi observada *in vivo* prevenindo convulsões induzidas por ácido quinolínico, agonista glutamatérgico (SCHMIDT *et al.*, 2000) e *in vitro*, estimulando a proliferação celular, síntese e liberação de uma variedade de fatores tróficos astrocitários (RATHBONE *et al.*, 1999). Neste modelo de PGO foi avaliado o efeito de GUO (1mM) sobre a viabilidade celular (Figura 15).

Foi observada uma redução significativa da viabilidade celular nas fatias submetidas a 15 e 60 min de privação de glicose/oxigênio seguidos ou não de reperusão de 2 horas com adição de GUO antes da reperusão. Quando GUO foi adicionado à incubação no período de reperusão foi observada uma tendência de reversão do dano causado pela isquemia *in vitro* de 15 min, porém não significativa. GUO adicionada no período de reperusão após 60 min de privação de glicose/oxigênio não alterou significativamente a viabilidade celular.

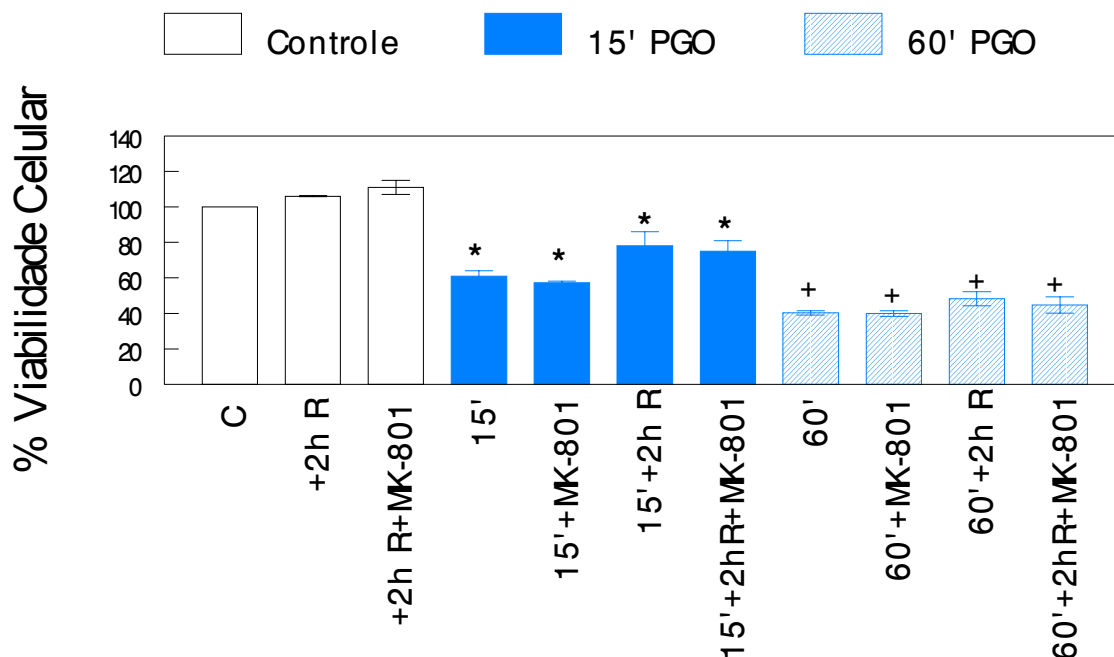
Recentes estudo têm demonstrado a liberação de aminoácidos durante situações que simulam a isquemia (PHILLIS & O'REGAN, 2003). Sendo o glutamato o principal aminoácido liberado e conhecendo os mecanismos de geração de excitotoxicidade glutamatérgica, avaliamos a viabilidade celular nas fatias hipocampais submetidas ao modelo de PGO e reperusão na presença de MK-801, que é um antagonista do receptor glutamatérgico NMDA.

Não foram observadas alterações significativas na viabilidade celular das fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO na presença de MK-801 (Figura 16).



**Figura 15. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e perfusão na presença de GUO.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), por 15 min (15'), ou 60 min (60') no modelo de PGO com ou sem GUO 1mM seguido de 1 hora (+ 1h R) ou 2 horas (+ 2h R) de perfusão com ou sem GUO. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco experimentos realizados em triplicata. \* indica médias significativamente diferentes do controle; + indica médias diferentes do controle e do grupo 15 min,  $p < 0,05$  (ANOVA seguida do teste de Tukey).





**Figura 16. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperusão na presença de MK-801.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), por 15 min (15'), ou 60 min (60') no modelo de PGO com ou sem MK-801 (50  $\mu$ M) seguido de 1 hora (+ 1h R) ou 2 horas (+ 2h R) de reperusão com ou sem MK-801. A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos realizados em triplicata. \* indica médias significativamente diferentes do controle; + indica médias diferentes do controle e do grupo 15 min,  $p < 0,05$  (ANOVA seguida do teste de Tukey).

### **3.2.4-Avaliação das defesas antioxidantes em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão**

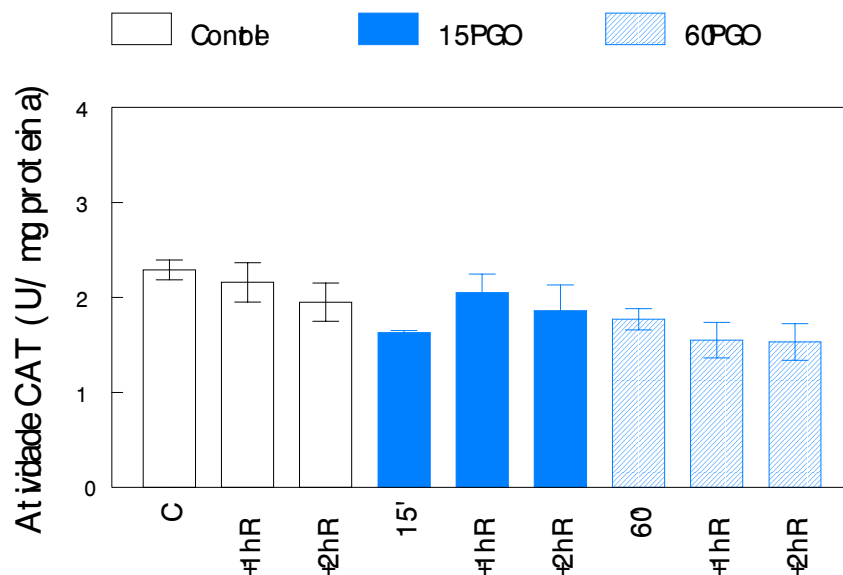
A capacidade antioxidante celular foi avaliada em fatias de hipocampo de ratos através da atividade das enzimas CAT, SOD, GR e GPx e dos níveis de glutathione total após serem submetidas a 15 e 60 min de PGO, seguida por períodos de reperfusão de 1 ou 2 horas.

Neste modelo, não foram observadas alterações significativas na atividade da CAT dosada nas fatias de hipocampo mantidas por 15 e 60 min de PGO seguida de um período de reperfusão de 1 ou 2 horas (Figura 17).

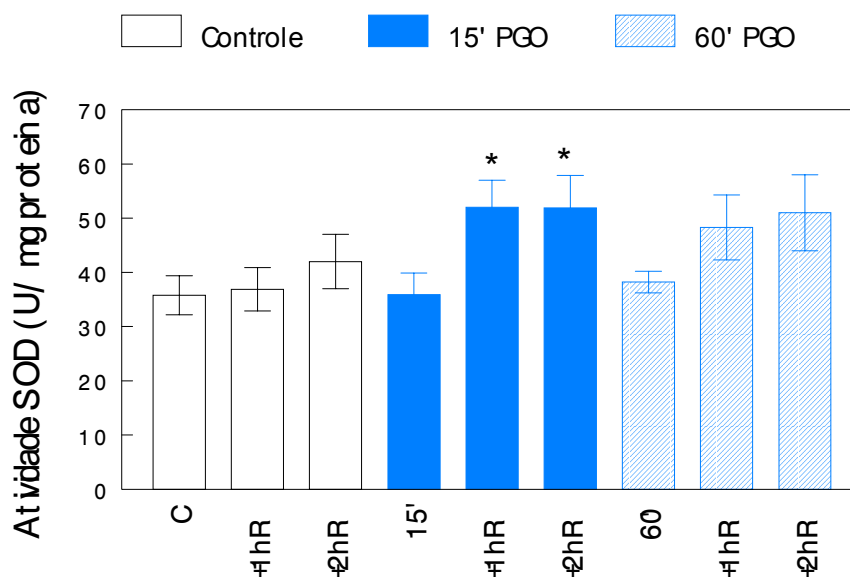
A SOD desempenha uma importante função na dismutação do radical ânion superóxido gerado durante situações de estresse oxidativo. No modelo de PGO e reperfusão, a atividade da SOD foi avaliada como um dos possíveis indicadores de estresse oxidativo celular em fatias de hipocampo.

Foram observadas alterações significativas na atividade da SOD quando as fatias foram submetidas a 15 min de PGO seguido de 1 e 2 horas de reperfusão (Figura 18).

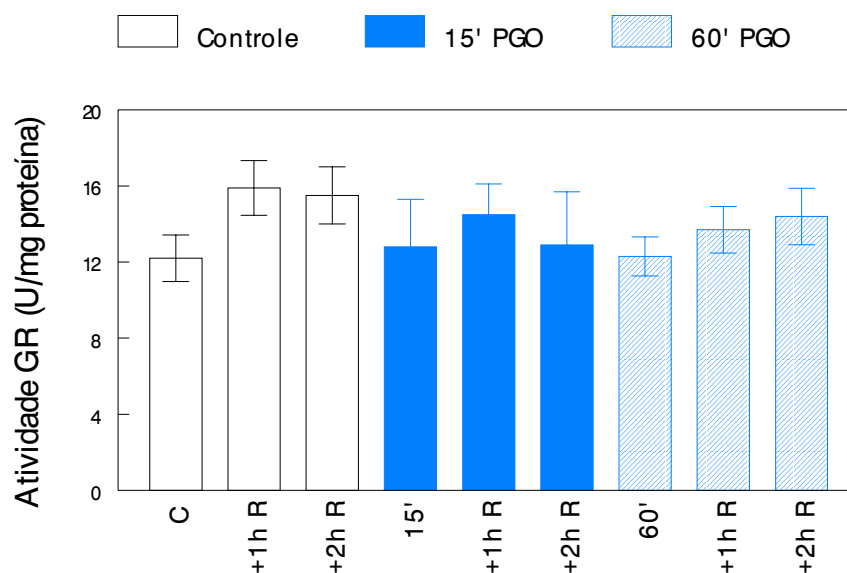
A GR é uma das enzimas responsáveis pela reciclagem da GSH-total. Alterações na sua atividade podem levar a um desbalanço nos níveis de GSH-t, tornando as células mais susceptíveis ao estresse oxidativo. Neste estudo, a atividade da GR foi avaliada, não sendo observadas alterações na atividade desta enzima nas fatias de hipocampos submetidas ao modelo de PGO e reperfusão (Figura 19).



**Figura 17. Avaliação da atividade da CAT em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), por 15 min (15'), ou 60 min (60') no modelo de PGO seguido de 1 hora (+ 1h R) ou 2 horas (+ 2h R) de reperfusão. A atividade da CAT foi dosada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco experimentos realizados em triplicatas.



**Figura 18. Avaliação da atividade da SOD em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperusão.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), por 15 min (15'), ou 60 min (60') no modelo de PGO seguido de 1 hora (+ 1h R) ou 2 horas (+ 2h R) de reperusão. A atividade da SOD foi dosada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco experimentos realizados em triplicatas.



**Figura 19. Avaliação da atividade da GR em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperusão.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), por 15 min (15'), ou 60 min (60') no modelo de PGO seguido de 1 hora (+ 1h R) ou 2 horas (+ 2h R) de reperusão. A atividade da GR foi dosada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos realizados em triplicatas.

Além de participar da reciclagem da GSSG em GSH reduzida, a GPx é importante para o SNC por atuar na degradação do peróxido de hidrogênio do meio intracelular, utilizando a GSH reduzida.

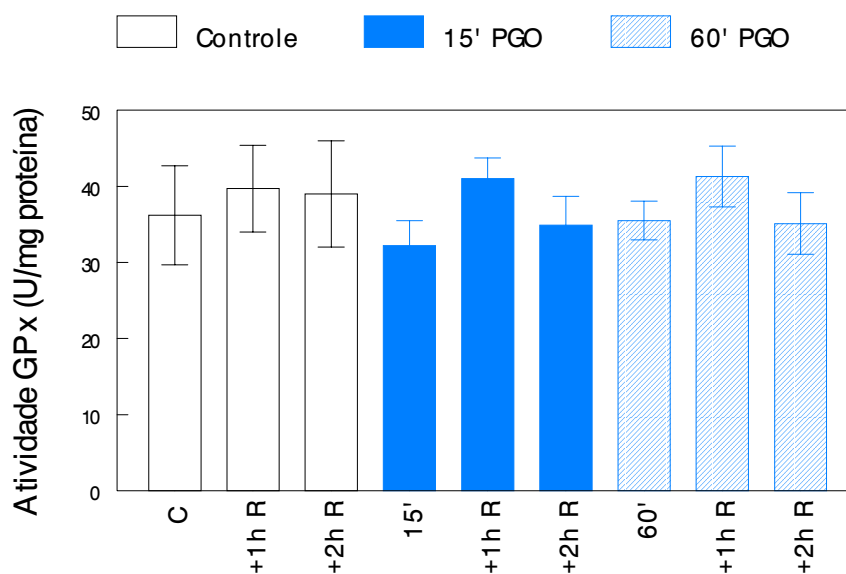
Não foram observadas alterações na atividade da GPx durante exposição ao modelo de PGO e reperfusão (Figura 20).

A quantificação dos níveis totais de glutathiona tem sido um bom modelo de avaliação de estresse oxidativo em hipocampo de ratos adultos (DAFRÉ, 2003). Devido à sua importância como marcador de estresse oxidativo no SNC, foi realizado a avaliação dos níveis de glutathiona no modelo PGO e reperfusão.

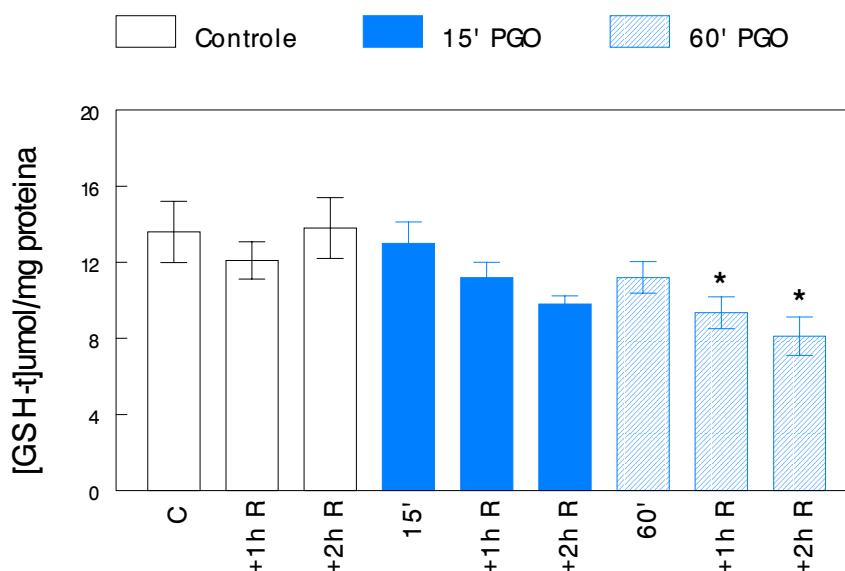
Foi observada uma redução significativa nos níveis de glutathiona total nas fatias de hipocampo submetidas a 60 min de privação de glicose/oxigênio seguida por reperfusão de 1 ou 2 horas (Figura 21).

Em situações de estresse oxidativo, devido ao desbalanço na homeostase celular, a GSH pode se conjugar com proteínas, formando tióis proteicos. Como os níveis totais de GSH apresentaram redução após um período de PGO e reperfusão, avaliamos o conteúdo de tióis protéicos nas fatias hipocampais como possível explicação para a depleção de GSH.

Não foram observadas alterações no conteúdo de tióis proteicos das fatias submetidas ao modelo de PGO e reperfusão (Figura 22).

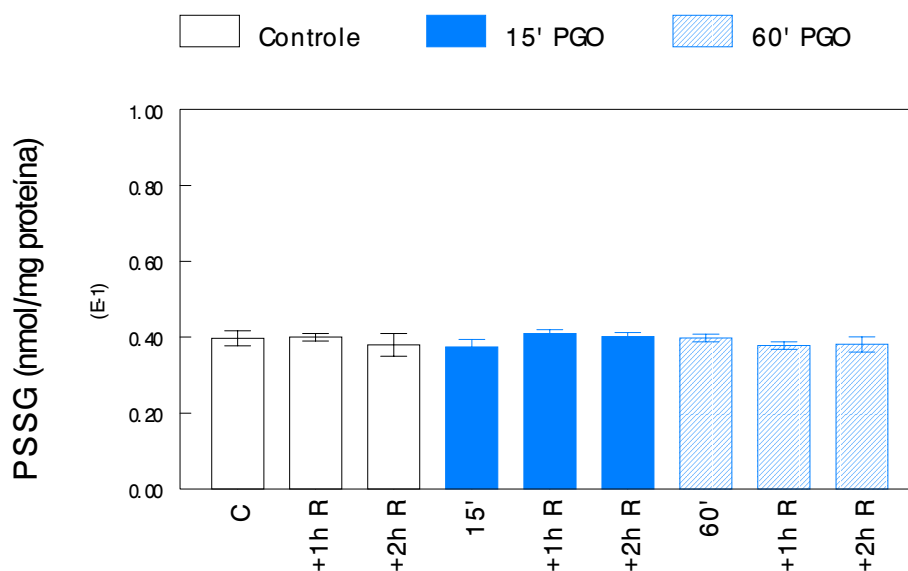


**Figura 20. Avaliação da atividade da GPx em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperusão.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), por 15 min (15'), ou 60 min (60') no modelo de PGO seguido de 1 hora (+ 1h R) ou 2 horas (+ 2h R) de reperusão. A atividade da GPx foi dosada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos realizados em triplicatas.



**Figura 21. Avaliação dos níveis de glutathiona total em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), por 15 min (15'), ou 60 min (60') no modelo de PGO seguido de 1 hora (+ 1h R) ou 2 horas (+ 2h R) de reperfusão. Os níveis totais de glutathiona foram avaliados conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média de quatro experimentos realizados em triplicata. \* indica médias significativamente diferentes do controle,  $p < 0,05$  (ANOVA seguida do teste de Tukey).



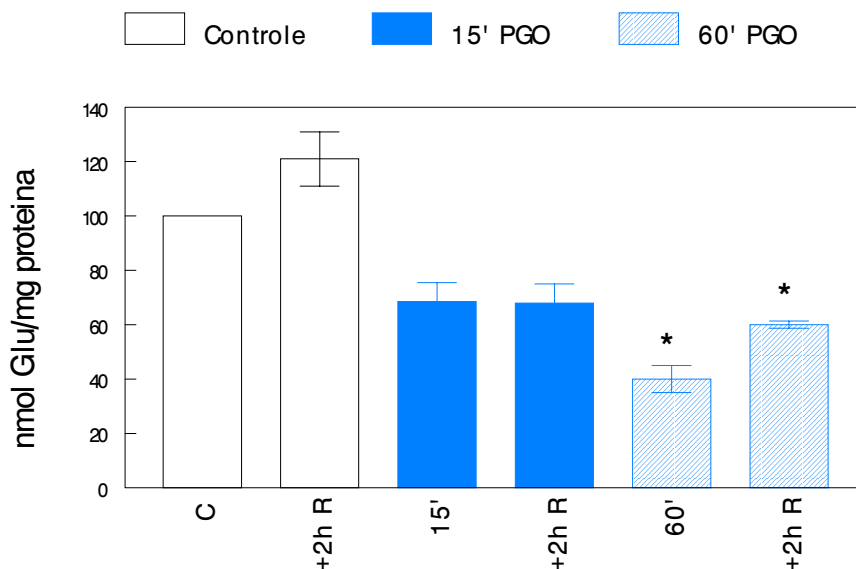


**Figura 22. Avaliação do conteúdo de tióis protéicos em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), por 15 min (15'), ou 60 min (60') no modelo de PGO seguido de 1 hora (+ 1h R) ou 2 horas (+ 2h R) de reperfusão. A avaliação do conteúdo de tióis protéicos foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média de três experimentos realizados em triplicata.

### **3.3- Avaliação da captação de [<sup>3</sup>H]Glutamato em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperfusão**

A captação de glutamato, realizada por transportadores de membrana específicos, dependentes de sódio, é responsável pela regulação da concentração glutamatérgica extracelular e fundamental para a prevenção da excitotoxicidade (DANBOLT, 2001).

Nas fatias hipocampais submetidas à PGO e reperfusão, pode-se observar uma diminuição significativa na captação de glutamato do meio extracelular, após 60 min de PGO seguida ou não de 2 horas de reperfusão (Figura 23).



**Figura 23. Avaliação da captação de  $[^3\text{H}]$ Glutamato em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de PGO e reperusão.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), por 15 min (15'), ou 60 min (60') no modelo de PGO seguido de 2 horas (+ 2h R) de reperusão. A avaliação da Captação de  $[^3\text{H}]$ Glutamato foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média de cinco experimentos realizados em triplicata. \* indica médias significativamente diferentes do controle,  $p < 0,05$  (ANOVA seguida do teste de Tukey).

## 4-DISCUSSÃO

### **AVALIAÇÃO DO DANO CELULAR INDUZIDO POR GLUTAMATO EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS**

O glutamato e seus receptores têm sido amplamente estudados, sendo reconhecidos como efetores importantes em processos patológicos como a isquemia e acidentes vasculares cerebrais. Através da excitotoxicidade, o glutamato está diretamente envolvido na gênese destas patologias (ROTHMAN & OLNEY, 1987; CHOI, 1988).

Neste trabalho, as fatias de hipocampo incubadas por 1 hora com glutamato não apresentaram alterações na viabilidade mesmo quando expostas a altas concentrações (1 e 10 mM) (Figuras 4 e 5). Provavelmente, as alterações na viabilidade celular induzidas por glutamato não sejam mensuráveis logo após o insulto, sendo necessário um tempo mais prolongado de incubação para que o dano excitotóxico seja avaliado.

Neste modelo, as fatias hipocampais foram mantidas em um tampão com a concentração iônica semelhante à encontrada fisiologicamente, mimetizando o meio extracelular. Considerando que neste modelo a captação de glutamato esteja funcional, a neurotoxicidade aguda em fatias cerebrais ocorre primeiramente devido a uma superestimulação dos receptores de glutamato e dependerá do tempo de incubação e do balanço iônico a que as fatias estão submetidas (GARTHWAITE *et al.*, 1992).

Já foi demonstrado que, quando a glicose está presente no meio de cultura de fatias de hipocampo submetidas a episódios de 1 hora de hipóxia, a sobrevivência neuronal é significativamente maior (CATER *et al.*, 2003). É possível que a ausência de alteração na viabilidade celular, demonstrada neste estudo, mesmo na presença de altas concentrações de glutamato, se deva à manutenção do gradiente iônico, assim como pela presença de glicose no

meio onde as fatias foram incubadas, favorecendo a homeostasia celular e resistência ao insulto glutamatérgico.

Através da avaliação da viabilidade celular realizada pelo método de redução do MTT, o qual mede a capacidade redutora da célula, foi demonstrado que fatias de hipocampo incubadas com glutamato diminuem significativamente a viabilidade somente a partir de 6 horas de incubação, sem alteração na liberação de LDH (MOLZ, 2003).

Embora já tenha sido demonstrado que a viabilidade avaliada após 1 hora de exposição ao glutamato não é alterada, neste estudo pretendíamos avaliar se em um período logo após um insulto agudo as enzimas antioxidantes celulares (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase) e os níveis de glutathione total (GSH-t) estariam sendo modulados ou mobilizados como estratégias iniciais para a defesa das células neurais. No entanto, não foram observadas alterações significativas nas atividades enzimáticas e nos níveis totais de GSH quando fatias de hipocampo foram incubadas por 1 hora com glutamato (Figuras 6-10), mostrando que provavelmente as alterações nas defesas antioxidantes, em situação iônica e metabólica fisiológica, também não são mensuráveis logo após um insulto agudo.

#### **AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR NO MODELO DE PRIVAÇÃO DE GLICOSE/OXIGÊNIO (PGO) EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS**

A isquemia cerebral resulta em degeneração celular severa, com conseqüente perda das funções cerebrais. Em modelos para avaliação de danos isquêmicos ao SNC, o hipocampo é utilizado por ser a região cerebral mais susceptível ao dano celular causado pela isquemia/hipóxia. Fatias de hipocampo mantidas *in vitro* são um modelo muito utilizado e

apresentam a vantagem de preservar a arquitetura do tecido hipocampal, mantendo as conexões celulares íntegras (CHOI *et al*, 1987; SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991).

No modelo de PGO, as fatias de hipocampo de ratos apresentaram redução significativa na viabilidade celular a partir de 30 min de PGO. Houve uma perda de 50 % da viabilidade quando as fatias foram incubadas por uma hora em PGO (Figura 11). Estes resultados estão de acordo com o observado por STRASSER & FISCHER (1995), que demonstraram que em cultura de fatias hipocampais submetidas a 60 minutos de privação de glicose/oxigênio ocorria uma perda de até 66 % da viabilidade celular, avaliada pela marcação com Iodeto de Propídio.

A PGO induziu uma pequena, porém significativa, diminuição da liberação de LDH a partir de 15 min (Figura 12). Geralmente, a liberação da LDH é utilizada como um parâmetro para evidenciar viabilidade celular, no entanto o que ela realmente avalia é a permeabilização da membrana celular (WHITAKER *et al.*, 1969). Tem sido demonstrado que na morte celular apoptótica não há alteração na permeabilidade de membrana, pois as células sofrem uma retração ao invés da alteração de permeabilidade e inchaço, que são características da necrose (SASTRY & RAO, 2000). Portanto, este resultado pode sugerir a ocorrência da indução de apoptose nas células neurais, já que houve diminuição significativa na viabilidade celular e também redução da liberação de LDH.

Glutamato (1mM) não potencializou o dano causado pela PGO (Figuras 11 e 12). Diversos trabalhos demonstram que durante insultos isquêmicos pode ocorrer uma liberação massiva de glutamato, contribuindo para a diminuição da viabilidade celular, causada pela excitotoxicidade glutamatérgica (TAN *et al*, 1998; PHILLIS & O'REGAN, 2003). Assim, possivelmente neste modelo de PGO esteja ocorrendo liberação de glutamato, de tal maneira que a adição de glutamato exógeno ao meio de incubação não promova dano adicional.

Já se demonstrou que períodos de reperfusão após insultos isquêmicos são os mais danosos às células neurais (SHARKEY *et al.*, 1997). Nesse período ocorre uma grande oferta de oxigênio às células causando um desbalanço energético intracelular e este pode não ser totalmente reduzido ocorrendo um aumento na produção de EROs.

A reperfusão posterior à PGO em fatias hipocampais não potencializou o dano causado pela PGO (Figura 13). Houve também redução significativa na liberação de LDH durante 15 min de PGO seguida de uma 1 hora de reperfusão e aos 60 min de PGO (Figura 14). Analisando estes experimentos em conjunto observa-se um perfil de redução de viabilidade celular que pode sugerir um quadro apoptótico nestas células neurais e que não é potencializado pela reperfusão.

Segundo NISHIZAWA (2001), a tentativa de neuroproteção com a utilização de antagonistas de receptores NMDA tem sido realizada, mostrando que os antagonistas de receptores glutamatérgicos podem proteger os neurônios dos danos isquêmicos (PARK, 1988; ALBIN, 1992).

Muitos efeitos biológicos do glutamato têm sido demonstrados como sendo mediados por receptores glutamatérgicos presentes na membrana celular pós sináptica. A adição de MK-801 antes, durante e 24 horas após um insulto isquêmico protege cultura de fatias hipocampais contra a perda de viabilidade, utilizando a metodologia de marcação por Iodeto de Propídio (RODNIGHT, 2001).

Porém, nos resultados obtidos neste trabalho, não foram evidenciadas alterações na viabilidade celular na presença de MK-801 nas fatias de hipocampo submetidas à PGO (Figura 16).

A guanosina também tem sido estudada como um agente neuroprotetor, atuando como antagonista de receptores glutamatérgicos (Ciccarelli *et al.*, 2001). Sua ação foi avaliada no modelo de PGO seguido de reperfusão. Quando GUO (1mM) foi adicionado durante os

períodos de PGO e na reperfusão, não houveram alterações significativas nas células neurais (Figura 15).

A toxicidade exercida pelo glutamato tem sido dividida em dois tipos: mediada por receptor e mediada por transportador. A primeira tem seu mecanismo baseado na despolarização da membrana seguida pelo influxo de íons cálcio ocasionado pela ativação de receptores (CHOI, 1988). A segunda requer a expressão celular do “antiporter” cistina/glutamato (BANNAI & KITAMURA, 1980; MURPHY *et al.*, 1989) e atua via um mecanismo não excitatório, através da inibição da captação de cistina, que leva à depleção de glutathione (CHEN *et al.*, 2000). Dessa forma, pode-se sugerir que a ação glutamatérgica sobre as fatias hipocâmpais submetidas à PGO esteja ocorrendo via transportadores, e não receptores de glutamato, uma vez que nem guanosina, nem MK-801 modularam seus efeitos.

Não houve alteração significativa na atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione redutase e peroxidase neste modelo de privação de glicose/oxigênio seguido de períodos de reperfusão (Figuras 17, 19 e 20).

A enzima superóxido dismutase sofreu um aumento significativo de sua atividade quando submetida ao modelo de PGO por 15 min seguida de 1 e 2 horas de reperfusão (Figura 18).

O aumento da atividade da superóxido dismutase indica um estado de estresse oxidativo que pode estar ocorrendo devido a uma produção aumentada de EROs. O radical ânion superóxido é um dos principais radicais gerado na mitocôndria e envolvido na produção de espécies reativas potencialmente danosas à célula, tais como o radical hidroxil e o peróxinitrito. A superóxido dismutase previne o acúmulo destes radicais, dismutando o ânion superóxido (MCCORD & FRIDOVICH, 1969). Sendo assim, o aumento da atividade desta enzima verificado no modelo de PGO e reperfusão nos indica uma tentativa de minimizar os danos causados pelo acúmulo de ânion superóxido nas fatias de hipocampo.



As alterações observadas na atividade da SOD no modelo de PGO e reperfusão sugerem que os níveis  $O_2^{\cdot-}$  estejam elevados, e com a ação da SOD, os níveis de  $H_2O_2$  também elevam-se. No SNC a atividade da CAT, responsável pela degradação do  $H_2O_2$ , é considerada baixa (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989), sendo a GPx responsável por esta ação no SNC. Porém, neste modelo não foram observadas alterações na atividade desta enzima.

Além das enzimas antioxidantes, outras defesas têm sido estudadas em modelos de isquemia cerebral, entre elas, os níveis da glutathiona cerebral. Já foi demonstrado que os níveis totais de glutathiona diminuem nas regiões de córtex frontal, estriado e hipocampo de ratos após um período de hipóxia /isquemia neonatal num modelo de oclusão da artéria carótida (DAFRÉ *et al.*, 2003).

Os níveis de GSH-t foram avaliados neste modelo de PGO e foi observado que em um período de 60 min de PGO seguido por 1 ou 2 horas de reperfusão houve uma redução significativa em seu conteúdo, quando comparado com o grupo controle (Figura 21).

Tem sido demonstrado que a isquemia pode promover uma liberação excessiva de glutamato, o qual poderia desencadear um processo excitotóxico. Em altas concentrações, o glutamato extracelular pode impedir a captação de cistina para dentro das células através do antiporter de glutamato/cistina (TAN *et al.*, 1998). Este sistema transporta cistina para dentro da célula e glutamato para fora, utilizando o gradiente de concentração de glutamato como força motora. A cistina captada é reduzida a cisteína e utilizada na síntese de glutathiona. Assim, o sistema antiporter glutamato/cistina auxilia na manutenção dos níveis celulares de glutathiona. Dessa forma, insultos isquêmicos podem inibir a captação de cistina através do antiporter, levando assim a depleção de glutathiona, provocando alterações no balanço antioxidante celular e tornando a célula mais susceptível ao estresse oxidativo (MURPHY *et al.*, 1989; CHO & BANNAI, 1990; OKA *et al.*, 1993).

Uma das possíveis explicações para a queda nos níveis de GSH durante o período de PGO seria a de sua conjugação com proteínas, formando os tióis protéicos. Porém, não houve alteração no conteúdo de tióis protéicos das fatias hipocâmpais quando submetidas à PGO (Figura 22).

Alternativamente, poderia estar ocorrer um efluxo de glutatona, a qual normalmente é liberada por astrócitos e captada por neurônios (WANG & CYNADER, 2000). Em uma situação de estresse, este fluxo pode estar comprometido, causando uma redução de glutatona nos diferentes tipos celulares. Outra possível alternativa para a depleção de glutatona, está relacionada com os mecanismos envolvidos no seu metabolismo, como a atividade da enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidase, responsável pela degradação da GSH. Estando a atividade desta enzima aumentada, haveria uma maior degradação de GSH, reduzindo seus níveis no meio intracelular.

BENVENISTE *et al* (1984) demonstraram, utilizando microdialise, os efeitos da isquemia em fatias de hipocampo de rato, sobre o aumento da liberação de alguns aminoácidos, dentre eles o glutamato.

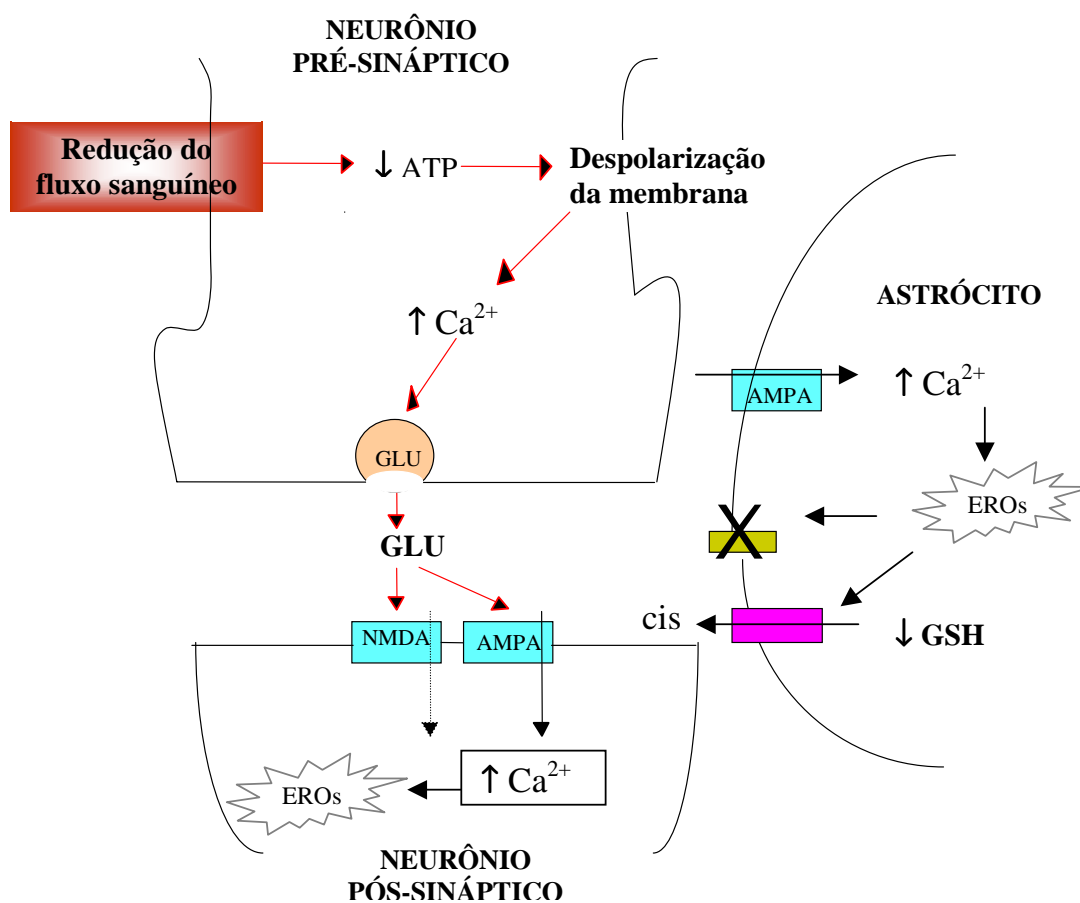
O mecanismo dependente de cálcio que promove um aumento extracelular de glutamato ocorre primeiramente através de despolarização, levando à liberação de vesículas com glutamato (SAVOLAINEN *et al*, 1995). O aumento de cálcio citosólico pode ocorrer devido a alterações no funcionamento da membrana plasmática ou pela sua liberação do retículo endoplasmático ou mitocôndria (KATSUMORI, 1999; ASAI *et al*, 2000; ROSSI *et al*, 2000). Porém, considerando os efeitos da despolarização e depleção de ATP sobre a rápida inativação e dessensibilização dos canais de cálcio, este modelo de liberação não é suficiente para promover o aumento progressivo e contínuo dos níveis de glutamato durante a isquemia. Sendo assim, após o início da liberação, esta é mantida, em parte, por mecanismos independentes de cálcio. Ocorre uma abertura de canais de cloreto, em casos de edema, e

reversão dos transportadores de glutamato dependentes de  $\text{Na}^+$ , permitindo a passagem de aminoácidos abaixo de seus gradientes de concentração.

Em hipocampo de ratos, os astrócitos apresentam uma contribuição mais importante para o efluxo de aminoácidos, uma vez que são eles os responsáveis pela retirada do glutamato da fenda sináptica através de seus transportadores de membrana (BENVENISTE, 1984; CHEN, 2000; DANBOLT, 2001).

A diminuição na captação de glutamato do meio extracelular após 60 min de PGO seguida de 2 horas de reperusão (Figura 23), pode ter sido causada pelo aumento na liberação de aminoácidos que ocorre durante a isquemia (PHILLIS & O'REGAN, 2003).

A Figura 24 representa o modelo proposto para o mecanismo de dano celular causado pela PGO, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. Sugere-se que a excitotoxicidade provocada pelo excesso de glutamato na fenda sináptica estaria contribuindo para a reversão dos transportadores e impedindo a captação de glutamato, o que associado à redução dos níveis de glutathione intracelular contribui para a exacerbação dos danos causados pelo insulto isquêmico.



**Figura 24:** Esquema representativo do modelo proposto para o mecanismo de dano celular causado pela PGO em fatias de hipocampo de ratos. A diminuição do fluxo sanguíneo reduz o conteúdo energético celular acarretando numa despolarização da membrana e conseqüente aumento nos níveis de cálcio intracelular e liberação de glutamato. O glutamato permeando a entrada de cátions, inicialmente via ativação de receptores AMPA, pode contribuir para a formação de EROs. Nesta situação, a diminuição ou inibição da atividade dos transportadores de glutamato e reversão do antiporter glutamato/cistina, pode ocasionar uma diminuição nos níveis de glutathiona.

## 5-CONCLUSÕES

- Fatias de hipocampo de ratos submetidas a glutamato em meio fisiológico, não apresentaram alterações significativas na viabilidade celular, na atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Glutathione redutase (GR), Glutathione peroxidase (GPx) e nos níveis de glutathione (GSH-t).

- Fatias de hipocampo de rato submetidas à privação de glicose/oxigênio (PGO) apresentaram redução significativa na viabilidade celular e na liberação de LDH, a partir de 30 e 15 min, respectivamente. Glutamato (1mM) não potencializou o dano causado pela PGO.

- A viabilidade celular das fatias de hipocampo submetidas à reperfusão após a PGO não sofreu alteração significativa.

- A adição dos antagonistas glutamatérgicos guanosina (1mM) ou MK-801 (50  $\mu$ M) às fatias submetidas à PGO e reperfusão não alterou a redução da viabilidade celular.

- A atividade das enzimas antioxidantes CAT, GR e GPx não apresentaram alterações significativas em fatias hipocámpais submetidas à PGO e reperfusão.

- A atividade da SOD aumentou significativamente em fatias submetidas a 15 min de PGO seguida de reperfusão de 1 ou 2 horas.

- Os níveis de GSH-t presentes em fatias hipocámpais submetidas a 60 min de PGO seguida por 1 e 2 horas de reperfusão, apresentaram redução significativa.

- O conteúdo de tióis proteicos presente nas fatias hipocámpais submetidas à PGO e reperfusão não apresentou alterações.

- As fatias de hipocampo submetidas a 60 min de PGO seguida de 2 horas de reperfusão, apresentaram redução significativa na captação de L-[ $^3$ H]glutamato.

## **6-PERSPECTIVAS**

- Avaliar a atividade da enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidase em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO e reperfusão.
- Verificar o efeito da N-acetil-cisteína sobre a viabilidade celular e na modulação dos níveis de glutathione nas fatias de hipocampo submetidas à PGO e reperfusão.
- Verificar o efeito de inibidores do transporte de glutamato sobre a viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO e reperfusão.
- Avaliar as vias de transdução do sinal e o tipo de morte celular envolvida no dano causado por PGO em fatias de hipocampo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIBHATLA, R.M.; HATCHER, J.F.; DEMPSEY, R.J. Phospholipase A<sub>2</sub>, hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia. **Antiox. Redox Signal.** v.5, p.647-654, 2003.
- AEBI, H. Catalase. In: Aebi H. Methods of enzymatic analysis. Academic press. v.105, p.121-126, 1984.
- AKERBOOM, T.P.M.; SIES, H. Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Meth. Enzymol.** v.77, p.373-382, 1981.
- AKERBOOM T.; SIES H. Glutathione transport and its significance in oxidative stress, in Glutathione: Metabolism and Physiological Functions (Vina J.,ed.), pp.45 –55.CRC Press, Boca Raton, Florida., 1990.
- ALBIN, R.L.; GREENAMYRE, J.T. Alternative excitotoxicity hypotheses. **Neurology** v.42, p.733–738, 1992.
- ALMEIDA, A.; BOLANOS, J.P.; MEDINA, J.M. Nitric oxide mediates glutamate-induced mitochondrial depolarization in rat cortical neurons. **Brain Res.** v.816, p.580–586, 1999.
- ANDERSON, M.F.; SIMS, N.R. The effects of focal ischemia and reperfusion on the glutathione content of mitochondria from rat brain subregions. **J. Neurochem.** v.81, p.541-549, 2002.
- ASAI, S.; ZHAO, H.; KOHNO, T.; TAKAHASHI, Y.; NAGATA, T.; ISHIKAWA, K. Quantitative evaluation of extracellular glutamate concentration in postischemic glutamate re-uptake, dependent on brain temperature, in the rat following severe global brain ischemia. **Brain Res.** v.864, p.60–68, 2000.
- BAINS, J.S.; SHAW, C.A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. **Brain Res. Rev.** v.25, p.335 –358, 1997.
- BANASIAK, K.J.; XIA, Y.; HADDAD, G.G. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog. Neurobiol.* v.62 , p.215–249, 2000.
- BANNAI, S.; KITAMURA, E. Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. **J. Biol. Chem.** v.255, p.2372–2376, 1980.
- BENVENISTE, H.; DREJER, J.; SCHOUSBOE, A.; DIEMER, N.H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. **J. Neurochem.** v.43, p.1369–1374, 1984.
- BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; McCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. **Nature** v.348, p.125-131, 1990.
- BRIGELIUS, R.; MUCKEL, C.; AKERBOOM, T.P.M.; SIES, H. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. **Biochem. Pharmacol.** v.32, p.2529–2534, 1983.
- CALBERG, E.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Meth.Enzymol.** v.113, p;484-490, 1985.

- CATER, H.L.; CHANDRATHEVA, A.; BENHAM, C.D.; MORRISON III, B.; SUNDSTROM, L.E. Lactate and glucose as energy substrates during, and after, oxygen deprivation in rat hippocampal acute and cultured slices. **J. Neurochem.** v.87, p.1381-1390, 2003.
- CHAN, P. H. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke** v.27, p.1124-1129, 1996.
- CHEN, C.J.; LIAO, S.L.; KUO, J.S. Gliotoxic Action of Glutamate on Cultured Astrocytes. **J. Neurochem.** v.75, p.1557-1565, 2000.
- CHO, Y.; BANNAI, S. Uptake of glutamate and cystine in C6 glioma cells and in culture astrocytes. **J. Neurochem.** v.53, p.2091-2097, 1990.
- CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and disease of nervous system. **Neuron.** v.1, p.623-634, 1988a.
- CHOI, D.W. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. **Trends Neurosci.** v.11, p. 465-469, 1988b.
- CHOI, D.W.; MAULUCCI-GEDDE, M.; KRIEGSTEIN, A.R., Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture, **J. Neurosci.** v.7, p.357-368, 1987.
- CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; GIULIANI, P.; D'ALIMONTE, I.; BALLERINI, P.; CACIAGLI, F. RATHBONE, M.P. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. **Glia** v.25, p.93-98, 1999.
- CICCARELLI, R.; BALLERINI, P.; SBATINO, G.; RATHBONE, M.P.; D'ONOFRIO, M.; CACIAGLI, F.; DI IORIO, P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. **Int. J. Dev. Neurosci.** v.19, p.395-414, 2001.
- CIMAROSTI, H.; RODNIGHT, R.; TAVARES, A.; PAIVA, R.; VALENTIM, L.; ROCHA, E.; SALBEGO, C. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neurosci. Lett.** v.315, p.33-36, 2001.
- CLARKE, D.D.; SOKOLOFF, L. Circulation and energy metabolism of the brain. In: **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects** (Siegel, G.J., Aggranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K. & Uhler, M.D., eds.), 637-669, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999.
- COLLINGRIDGE, G. L.; LESTER, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol. Rev.** v.40, p.144-209, 1989.
- COOPER, A.J.L. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: **The Molecular and Genetics Basis of Neurological Disease** (Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., DiMauro, S., Barchi, R.L. & Kunk, L.M., eds.) 1195-1230, Butterworth-Heinemann, Boston, 1997.
- DAFRÉ, A.L. S-Tiolação proteica como estratégia antioxidante e de regulação enzimática. Hemoglobina e glutathione-S-transferase microssomal como modelos. Tese de Doutorado, UFRGS, Porto Alegre, 1996.
- DAFRÉ, A.L.; ARTENI, N.S.; SIQUEIRA, I.R.; NETTO, C.A. Perturbations in the thiol homeostasis following neonatal cerebral hypoxia-ischemia in rats. **Neurosci. Lett.** v.345, p.65-68, 2003.
- DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.** v.65, p.1-105, 2001.
- DAVIES, K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochem. Soc. Symp.** v.61, p.1-31, 1995.



- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide neurotoxicity, **J. Chem. Neuroanat.** v.10, p.179–190, 1996.
- DEV, K.H.; ROBERTS, P.J.; HENLEY, J.M. Characterisation of the interaction between guanyl nucleotides and AMPA receptors in rat brain. **Neuropharmacology**. v.35, p.1583–1593, 1996.
- DI IORIO, P.; BALLERINI, P.; CACIAGLI, F.; CICCARELLI, R. Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. **Pharmacol. Res.** v.37, p.169–178, 1998.
- DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ M. A. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. **Trend Neurosci.** v.22, p.391–397, 1999.
- DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M. & HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in the brain. **Eur. J. Biochem.** v.267, p.4912–4916, 2000.
- DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J. Glutathione pathways in the brain. **Biol.Chem.** v.384, p.505–516, 2003.
- DUVOISIN, R.M.; ZHANG, C.; RAMONELL, K. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. **J. Neurosci.** v.15, p.3075–3080, 1995.
- FONNUM, F.; LOCK, E.A. The contributions of excitotoxicity, glutathione depletion and DNA repair in chemically induced injury to neurones: exemplified with toxic effects on cerebellar granule cells. **J. Neurochem.** v.88, p.513–531, 2004.
- FRIZZO, M.E.S.; LARA, D.R.; PROKOPIUK, A.S.; VARGAS, C.R.; SALBEGO, C.Z.; WAJNER, M.; SOUZA, D.O. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. **Cell Mol. Neurobiol.** v.22, p.353–363, 2002.
- GADEA, A.; LÓPEZ-COLOMÉ, A.M. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA. I. Glutamate transporters. **J. Neurosci. Res.** v.63, p.453–460, 2001.
- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intercellular messenger in the brain. **Nature**. v.336, p.385–387, 1988.
- GARTHWAITE, G.; WILLIAMS, G.D.; GARTHWAITE, J. Glutamate toxicity: an experimental and theoretical analysis. **Eur. J. Neurosci.** v.4, p.353–360, 1992.
- GASIC, G.P. ; HOLLMAN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annu. Rev. Physiol.** v.54, p.507–536, 1994.
- GERLACH, M.; BEN-SHACHAR, D.; RIEDERER, P.; YODIM, M.B.H. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? **J. Neurochem.** v.63, p.793–807, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine .Oxford University Press, New York. 1989.
- HIMI, T.; IKEDA, M.; YASUHARA, T.; MUROTA, S. Oxidative Neuronal Death Caused by Glutamate Uptake Inhibition in Cultured Hippocampal Neurons. **J. Neurosci. Res.** v.71, p.679–688, 2003.
- HUNTER, A.J.; MACKAY, K.B.; ROGERS D.C. To what extent have functional studies of ischemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents? **Trends Pharmacol. Sci.** v.19, p.59–66, 1998.

- ISAACSON, J. S.; NICOLL, R. A. The uptake inhibitor L-trans-PDC enhances responses to glutamate but fails to alter the kinetics of excitatory synaptic currents in the hippocampus. **J. Neurophysiol.** v.70, p.2187-2191, 1993.
- JIANG, Q.; ZHENGLIN, G.; ZHANG, G.; GUOZHANG, J. Diphosphorylation and involvement of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in glutamate-induced apoptotic-like death in cultured rat cortical neurons. **Brain Res.** v. 887, p.285-292, 2000.
- JOCELYN, P. Spectrophotometric assay of thiols. *Meth. Enzymol.* v.143, p.44-67, 1987.
- LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P.A. Mechanisms of disease. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. **New Eng. J. Med.** v.330, p.613-622, 1994.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, p.265-275, 1951.
- MALCON, C.; ACHAVAL, M.; KOMLUS, S.; PARTATA, W.; SAURESSIG, M.; RAMÍREZ, G.; SOUZA, D.O. GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH diaphorase-positive cells in the rat striatum. **Neurosci. Lett.** v.225, p.145-148, 1997.
- MANNERVIK, B.; AXELSSON, K. Role of cytoplasmic thioltransferase in cellular regulation by thiol-disulphide interchange. **Biochem. J.** v.190, p.125-130, 1980.
- MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** v.1, p.120-129, 2000.
- MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** v.244, p.6049-6055, 1969.
- MECOCCI, P.; MacGARVEY, U.; KAUFMAN, A.E.; KOONTZ, D.; SHOFFNER, J.M.; WALLACE, D.G.; BEAL, M.F. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. **Ann. Neurol.** v.34, p.609-616, 1993.
- MEISTER A. AND ANDERSON M. E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** v.52, p.711-760, 1983.
- MELDRUM, B.S. Protection against ischemic neuronal damage by drugs acting on excitatory neurotransmission. **Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.** v.2, p.27-57, 1990.
- MELDRUM, B.S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. **J. Nutr.** v.130, p.1007S-1015S, 2000.
- MICHAELIS, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Prog. Neurobiol.** v.54, p.369-415, 1998.
- MOLZ, S.; OLIVEIRA, I.J.L.; SOUZA, D.O.; TASCA C.I. GMP prevents toxicity in hippocampal slices submitted to glutamate in a chemical model of ischemia. **J. Neurochem.** v.79, p.196, Abstract BP23-33, 2001.
- MOLZ, S. Estudo da morte celular induzida por glutamato e sua modulação por guanosina-5'-monofosfato em fatias de hipocampo de ratos. Dissertação de mestrado. UFSC, Florianópolis, 2003.
- MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity. **J. Immunol. Methods.** v.65, p. 55-63, 1983.
- MURPHY, T.H.; MIYAMOTO, M.; SASTRE, A.; SCHNAAR, R.L.; COYLE, J.T. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. **Neuron.** v.2, p.1547-1558, 1989.

- NAITO, S.; UEDA, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. **J. Neurochem.** v.44, p.99-109, 1985.
- NELSON, N. The family of Na/Cl neurotransmitter transporters. **J. Neurochem.** v.71, p.1785–1803, 1998.
- NISHIZAWA, Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia **Life Sci.** v.69, p.369–381, 2001.
- OKA, A.; BELLIVEAU, M.J.; ROSENBERG, P.A.; VOLPE, J.J. Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: Pharmacology, mechanism and prevention. **J. Neurosci.** v.13, p.1441-1453, 1993.
- OLIVEIRA, I.L.J.; MOLZ, S.; SOUZA, D.O.; TASCA, C.I. Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an *in vitro* model of ischemia. **Cell. Molec. Neurobiol.** v.23, p.335-344, 2002.
- OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.. **Science.** v.164, p.719-721, 1969.
- OLNEY, J. W. Kainic acid and other excitotoxins: a comparative analysis. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.** v.27, p.375-384, 1981.
- OLNEY, J.W. ; HO, O.L. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. **Nature** v.227, p.609-611, 1970.
- O'REGAN, M.H., SONG, D., VANDERHEIDE, S.J., PHILLIS, J.W. Free radicals and the ischemia-evoked extracellular accumulation of amino acids in rat cerebral cortex. **Neurochem. Res.** v.22, p.273–280, 1997.
- PAAS, Y.; DEVILLERS-THIERY, A.; CHANGEUX, J. P.; MEDEVIELLE, F.; TEICHBERG, V. I. Identification of an extracellular motif involved in the binding of guanine nucleotides by a glutamate receptor. **EMBO J.** v.15, p.1548-1556, 1996.
- PARK, C.K.; NEHLS, D.G.; GRAHAM, D.I.; TEASDALE, G.M.; McCULLOCH, J. The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. **Ann. Neurol.** v.24, p.543–551, 1988.
- PAZ, M. M.; RAMOS, M.; RAMÍREZ, G.; SOUZA, D. O. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum. **FEBS Letters.** v.355, p.205-208, 1994.
- PHILLIS, J.W.; O'REGAN, M.H. Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. **Neurochem. Intl.** v.43, p.461–467, 2003.
- POCOCK, J.M.; NICHOLLS, D.G. Exocytotic and nonexocytotic models of glutamate release from cultured cerebellar granule cells during chemical ischemia. **J. Neurochem.** v.70, p.806-813, 1998.
- PORCIUNCULA, L.O.; VINADÉ, L.; WOFCHUK, S.; SOUZA, D.O. Guanine gased purines inhibit [<sup>3</sup>H]Glutamate and [<sup>3</sup>H] AMPA binding at postsynaptic densities fro cerebral cortex of rats. **Brain Res.** v.928, p.106-112, 2002.
- RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.J.; GYSBERS, J.W.; ANDREW, C.; HERMAN, M.A.R.; REED, J.K.; CICCARELI, R.; DI IORIO, P., CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progr. Neurobiol.** v.59, p.663-690, 1999.
- REGNER, A.; RAMÍREZ, G.; BELLÓ-KLEIN, A.; SOUZA, D. O. Effects of guanine nucleotides on glutamate-induced chemiluminescence in rat hippocampal slices submitted to hypoxia. **Neurochem. Res.** v.23, p.523-528, 1998.

- ROBINSON, M. B.; DOWD, L. A. Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. **Adv. Pharmacol.** v.37, p.69-115, 1997.
- ROBINSON, M.B. Regulated trafficking of neurotransmitters: common notes but different melodies. **J. Neurochem.** v.80, p.1–11, 2002.
- ROSSI, D.J.; OSHIMA, T.; ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. **Nature**, v.403, p.316-321, 2000.
- ROTHMAN, S.M.; OLNEY, J.W. Excitotoxicity and the NMDA receptor. **Trends Neurosci.** v.10, p.299–302, 1987.
- SASTRY, P.S.; RAO, K.S. Apoptosis and the nervous system. **J. Neurochem.** v.74, p.1-20, 2000.
- SAVOLAINEN, K.M.; LOIKKANEN, J.; NAARALA, J. Amplification of glutamate-induced oxidative stress. **Toxicol. Lett.** v.82/83, p.399-405, 1995.
- SCHMIDT, A.P.; LARA, D.R.; MARASCHIN, J.F.; PERLA, A.S.; SOUZA, D.O. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Res.** v.864, p.40-43, 2000.
- SCHMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neurosci.** v.40, p. 599-636, 1991.
- SEGOVIA, G.; PORRAS A.; ARCO D. A.; MORA F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mech. Ageing Develop.** v.122, p.1-29, 2001.
- SHARKEY, J.; KELLY, J. S.; BUTCHER, S. P. In: Clinical Pharmacology of Cerebral Ischemia (Ter HORST, G. J. & KORF, J., eds), 235-263, Human Press, 1997.
- SHEARDOWN, M. J.; NIELSEN, E. O.; HANSEN, A. J.; JACOBSEN, P.; HONORÉ, T. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. **Science.** v.247, p.571-574, 1990.
- SIES, H; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Lett.** v.103, p.287-290, 1979.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am. J. Med.** v.91, p. 31S-38S, 1991.
- SIESJO, B.K.; KATSURA, K.; KRISTINA, T. Acidosis-related damage. **Adv. Neurol.** v.71, p.209-233, 1996.
- SOUZA, D. O. ; RAMÍREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. **J. Mol. Neurosci.** v.3, p. 39-45, 1991.
- STRASSER, U.; FISCHER, G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. **J. Neurosci. Methods** v.57, p.177-186, 1995.
- TAN, S.; SAGARA, Y.; LIU, Y.; MAHER, P.; SCHUBERT, D. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. **J. Cell Biol.** v.141, p.1423–1432, 1998.
- TASCA, C.I.; BURGOS, J.S.; BARAT, A.; SOUZA, D.O.; RAMÍREZ, G. Chick kainate binding protein lacks GTPase activity. **NeuroReport.** v.10, p.1981-1983, 1999.

- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.** v.27, p.502-522, 1969.
- VANNUCCI, R.C.; CONNOR, J.R.; MAUGER, D.T.; PALMER, C.; SMITH, M.B.; TOWFIGHI, J.; VANNUCCI, S.J. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. **J. Neurosci. Res.** v.55, p.158–163, 1999.
- WANG, X.F.; CYNADER, M.S. Astrocytes Provide Cysteine to Neurons by Releasing Glutathione. **Journal of Neurochemistry.** v.74, p.1434-1442, 2000.
- WHITAKER, J.F. Lactate dehydrogenase as a cytoplasmatic marker in brain. **Clin. Chim. Acta.** v.24, p.23-27, 1969.
- WLODEK, L. Beneficial and harmful effects of thiols. **Pol. J. Pharmacol.** v.54, p.215-223, 2002.
- WULLNER, U.; SEYFRIED, J.; GROSCURTH, P.; BEINROTH, S.; WINTER, S.; GLEICHMAN, M.; HENEKA, M.; LOSCHMANN, P.; SCHULZ, J.B.; WELLER, M.; KLOCKGETHTER, T. Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. **Brain Res.** v.826, p.53-62, 1999.